UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

N° 1194

EPURATION BIOLOGIQUE DES EAUX DE BOISSONS PAR LE SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - CUIVRE GENERATEUR DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

THESE

pour le Doctorat de l'Université de LYON

Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 14 Décembre 1962

par

DHIEN Jean

né le 12 Avril 1937 à Chabons (Isère)

TRAVAIL DE LA DIVISION DE MICROBIOLOGIE DU CENTRE DE RECHERCHES DU SERVICE DE SANTE DES ARMEES

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

EPURATION BIOLOGIQUE DES EAUX DE BOISSONS PAR LE SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - CUIVRE GENERATEUR DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

THESE

pour le Doctorat de l'Université de LYON

Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement

devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 14 Décembre 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

par

DHIEN Jean

né le 12 Avril 1937 à Chabons (Isère)

TRAVAIL DE LA DIVISION DE MICROBIOLOGIE DU CENTRE DE RECHERCHES DU SERVICE DE SANTE DES ARMEES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550013_0019

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire
membre de l'Institut.

M. H. HERMANN : Doyen
correspondant de l'Institut.

MM. M. LEVRAT : Assesseur
L. REVOL : Assesseur.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

PROFESSEURS

MM.	HERMANN	Physiologie
	CIBERT	Clinique Urologique
	PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique Biologique
	DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène mentale
	ROCHET	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
	CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
	WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
	PAUPERT RAVAULT	Clinique Médicale B
	FROMENT	Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires
	CROIZAT	Clinique Médicale C
	ENSELME	Chimie Biologique et Médicale
	MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
	GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie Infantile
	REVOL	Pharmacie Galénique et Matière Médicale
	POLLOSSON	Clinique Gynécologique
	PIGEAUD	Clinique Obstétricale
	BOURRET	Médecine du Travail
	LEVRAT	Clinique Médicale A
	SOHIER	Hygiène et Action Sanitaire et Sociale
	DUCLOS	Clinique Stomatologique
	BERNHEIM	Clinique Médicale Infantile et Hygiène du Premier Age
	JOURDAN	Biologie Médicale et Pharmacodynamie
	NETIEN	Botanique et Cryptogamie
	BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
	BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique
	DREVON	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
	ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
	COUDERT	Parasitologie et Pathologie Exotique
	MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie

MM.	PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
	THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
	BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
	CREYSSEL	Clinique Traumatologique des membres
	DARGENT	Cancérologie
	GUICHARD	Anatomie Pathologique
	GIRARD Paul	Pathologie Générale et Expérimentale
	LATARJET	Anatomie
	PEYCELON	Pathologie Chirurgicale
	GIRARD Marcel	Thérapeutique
	VACHON	Pathologie Médicale
	GALY	Physio-Pathologie des Voies Respiratoires
	KEHL	Histologie et Embryologie
	PAPILLON	Radiologie
	JEUNE	Clinique des Maladies Infectieuses
	GONIN	Hydrologie Thérapeutique, Climatologie et Ecologie Sociale
	MONNET	Bactériologie
	BANSSILLON	Physiologie et Pathologie Obstétricales
	CHARDONNET	Physiologie
	GUINET	Clinique des Maladies Endocrinologiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM.	BERGER	Physique Nucléaire appliquée à la Médecine
	DORCHE	Technologie Pharmaceutique
	CIER J. François	Physiologie
	BERTOYE	Bactériologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

	ROMAN	Parasitologie
	CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
	PERROT	Chimie Organique et Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

Médecine

MM.	FEROLDI	Anatomie Pathologique
	CREYSSEL Roger	Chimie Biologique et Médicale
	DUROUX Emile	Anatomie
	BRETTE René	Thérapeutique
	DUMONT Louis	Histologie
	THIVOLET Jean	Hygiène
	GARIN Jean Paul	Parasitologie
	MORET Robert	Physique
	BOUCHET Alain	Anatomie
	TOMMASI Michel	Anatomie Pathologique
	RIFFAT Georges	Hygiène
	JOUVET Michel	Pathologie Expérimentale
	FAVRE-GILLY Jean	Hématologie

Pharmacie

MM. ODDOUX Lucien	Botanique et Cryptogamie
MALLEIN René	Chimie Analytique
GRAS Jean	Chimie Biologique
PEYRIN Jean Olivier	Physique

AGREGES EN EXERCICES

PONT Maurice	Médecine Générale
VIGNON Georges	"
REVOL Louis	"
PLAUCHU Marcel	"
TRAEGER Jules	"
MARION Pierre	Chirurgie Générale
MICHAUD Pierre	"
JAUBERT de BEAUJEU Michel	"
SAUTOT Jean	"
GUILLEMIN Georges	"
BURTHIAULT René	Obstétrique
GIGNOUX Marcel	Oto-Rhino-Laryngologie
FRANCOIS René	Pédiatrie
FREIDEL Charles	Stomatologie
DEVIC Michel	Médecine Générale
DESPIERRES Charles	"
de MOURGUES Georges	Chirurgie Générale
FRANCILLON Jacques	"
SAUBIER Eugène	"
COLOMB Daniel	Dermatologie
COLIN Marcel	Médecine Légale
TOLOT François	Médecine du Travail
GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
SCHOTT Bernard	"
DUMONT Martial	Obstétrique
BONAMOUR Georges	Ophtalmologie
DURAND Louis	Urologie
GARDE Alexandre	Médecine Générale
PERRIN André	"
LARBRE François	"
MORNEX René	"
NORMAND Jean	"
MARET Gilbert	Chirurgie Générale
DESCOTES Jacques	"
CHASSARD Jean Louis	Electro-Radiologie
ALLEGRE Georges	Neuro-Chirurgie
HUGONNIER René	Ophtalmologie
FAYSSE Robert	Orthopédie
GAILLARD Jean	Oto-Rhino-Laryngologie
KALB Jean Claude	Pneumo-Phtisiologie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM. : SOHIER
MONNET
CIER
BOUCHERLE

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. SOHIER

Professeur d'Hygiène à la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon.
Professeur Agrégé du Val-de-Grâce.
Membre correspondant de l'Académie de
Médecine.
Expert de l'O.M.S.
Officier de la Légion d'Honneur.

Il nous a fait le grand honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

- Monsieur le Professeur P. MONNET

Professeur de Bactériologie à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.

Nous sommes très heureux qu'il ait accepté de juger notre travail. Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre reconnaissance.

- Monsieur le Professeur A. CIER

Professeur à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon.
Agrégé de Pharmacie Chimique et de Pharmacologie.

Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail qui constitue une application particulière de ses travaux. Qu'il veuille bien accepter notre respectueuse reconnaissance.

- Monsieur le Professeur A. BOUCHERLE

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Grenoble.

Nous avons tout particulièrement au cours de nos études apprécié son enseignement, nous le remercions d'être venu représenter notre Faculté d'origine malgré son éloignement. Nous lui exprimons toute notre gratitude.

A Monsieur le Médecin-Commandant COLOBERT

Maître de recherches des Services de Santé des Armées.
Chef de la division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

Il nous a accueilli dans son laboratoire avec beaucoup de bienveillance. Ce séjour nous a été profitable et nous y avons beaucoup appris.

Il nous a confié ce travail tout en nous donnant beaucoup de facilités pour l'accomplir et en nous suivant pas à pas dans sa réalisation.

En nous permettant de présenter cette thèse, il nous prouve sa confiance.

Nous ne saurions trop lui exprimer toute notre gratitude et notre respectueux attachement.

- A Monsieur le Pharmacien-Capitaine NOFRE

Assistant de Biologie appliquée aux Armées.

Nous avons souvent eu recours à ses conseils et à ses connaissances exceptionnelles sur la chimie des radicaux libres.

Nous tenons à l'en remercier et à l'assurer de notre reconnaissance.

- A Madame N. FONGRENAN, Messieurs R. GROSJEAN, J. SERERO, Y. BAUDRY.

pour leur collaboration technique.

- A nos camarades du Laboratoire.

- A tout le personnel de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

A NOS MAITRES DE LA FACULTE

MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE

GRENOBLE.

INTRODUCTION

A la suite des travaux des laboratoires de la Division de Microbiologie et de la Division de Chimie et Pharmacologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, mettant en évidence le mécanisme et l'activité bactéricide et virulicide des systèmes chimiques générateurs du radical libre hydroxyle, le Médecin-Commandant COLOBERT nous a demandé de chercher à mettre au point un système chimique capable d'assurer au point de vue biologique l'épuration des eaux de boisson. Le système acide ascorbique - cuivre s'étant montré très actif, nous l'avons adopté. Nos recherches ont consisté à préciser les proportions convenables relatives de l'acide ascorbique et du cuivre, de vérifier l'efficacité de ce système sur des bactéries et des virus variés et enfin de déterminer l'influence des facteurs physico-chimiques.

Dans une première partie nous étudierons les principaux modes de formation du radical libre hydroxyle.

Dans la seconde partie, sont exposées nos recherches personnelles.

PREMIERE PARTIE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

MODE DE FORMATION DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

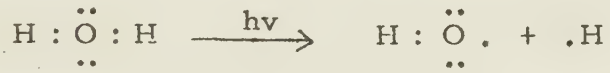
DEFINITION

Les radicaux libres sont des fragments moléculaires électriquement neutres, mais qui comportent un électron célibataire et qui ont par conséquent un nombre impair d'électrons. Le radical hydroxyle sera donc un fragment moléculaire, sans charge électrique et possédant un électron non apparié, composé de l'association d'un atome d'hydrogène et d'un atome d'oxygène, de formule HO. (le point en exposant indique la présence d'un électron célibataire).

MODE DE FORMATION PHYSIQUE

Les radiations ultraviolettes.

Lorsqu'un photon u.v. de longueur d'onde (< 1850 Å), heurte un électron de la molécule d'eau, il peut, en lui transférant son énergie, le délocaliser de son orbitale, et provoquer un désappariement d'un doublet électronique suivant la réaction :

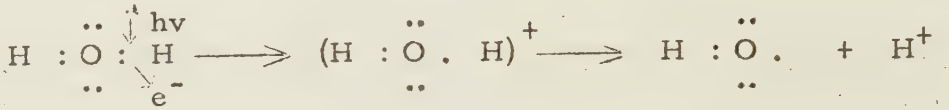


Le mécanisme de stérilisation par les rayons u.v. ne mettra ce phénomène que très secondairement en jeu puisque la lumière solaire ne contient pas cet ultraviolet lointain qui est absorbé par les couches de la haute atmosphère ; de même, les lampes germicides classiques n'émettent que très faiblement cet ultraviolet lointain.

Avec le proche ultraviolet, un rôle toutefois peut être attribué au radical hydroxyle, lorsque ce dernier est libéré soit à partir de l'eau par photo sensibilisation, soit à partir du peroxyde d'hydrogène par photolyse directe. Il est possible que ces deux mécanismes participent à l'autostérilisation des eaux, qui contiennent souvent des sels métalliques dissous, ces derniers pouvant agir comme agents photo-sensibilisants de la décomposition de l'eau .

Les radiations ionisantes.

Quand un photon de grande énergie (photon X ou V) rencontre un électron d'une molécule d'eau, son énergie va lui permettre d'éjecter l'électron hors de la molécule. S'il s'agit de l'eau, la molécule perd un électron :



La molécule d'eau, devenue ainsi l'ion moléculaire $H_2O.^+$, se dissocie en radical libre hydroxyle et en ion hydrogène. L'électron éjecté dans cette réaction est capté par une autre molécule d'eau et entraîne sa scission en donnant un ion hydroxyle et un atome libre d'hydrogène :

La radiolyse de l'eau conduit donc à un radical libre hydroxyle et à un atome d'hydrogène.

PROCEDES CHIMIQUES DE PRODUCTION DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

Il est possible de former avec des réactifs chimiques des radicaux libres hydroxyles, en faisant intervenir des réactions d'oxydo-réduction, par transfert d'électron entre un ion métallique de la série de transition et une molécule déterminée (peroxyde d'hydrogène, oxygène), qui ainsi activée pourra donner un radical libre hydroxyle.

Activation du peroxyde d'hydrogène

Réactif de FENTON. FENTON (35) constatait, à la fin du siècle dernier, que le peroxyde d'hydrogène en présence d'ion ferreux (sulfate ferreux), devenait fortement oxydant.

Cette exaltation du pouvoir oxydant du peroxyde d'hydrogène par le sulfate ferreux fut expliquée plus tard par HABER et WEISS (41), grâce au schéma réactionnel suivant :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO.$$

Cette hypothèse fut largement confirmée par BAXENDALE (7), CIER et NOFRE en 1959 (16), URI (86), WEISS (89).

La réaction ne s'arrête pas à ce stade, mais les ions ferriques ainsi formés peuvent être à leur tour réduits en ions ferreux par le peroxyde d'hydrogène, sous forme de dissociation hétérolytique :

$$HO_2^- H^+ + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + H^+ + HO_2.$$

Le radical perhydroxyle $HO_2.$ se protolyse en engendrant l'ion radical superoxyde $O_2^-.$ qui réduit un ion ferrique avec formation d'oxygène moléculaire :

$$HO_2. \longrightarrow H^+ + O_2^-.$$

$$O_2^-. + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

Ce processus de reconversion des ions ferriques en ions ferreux, explique la nature catalytique du phénomène.

La réactivité de ce radical libre hydroxyle repose à la fois sur son énergie de dissociation de liaison égale à 120 Kcalories pour H...OH et sur sa forte affinité électronique en solution aqueuse (voisine de 136 Kcalories d'après URI (86)).

Potentialisation du réactif de FENTON. CIER et NOFRE (16) ont proposé récemment de chélater l'ion ferreux par le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique. Cette chélation de l'ion ferreux permet d'exalter les propriétés catalytiques de cet ion métallique, par abaissement de son potentiel d'oxydo-réduction (93) et de pouvoir utiliser ce réactif à son pH optimal qui est voisin de 7. En effet, en absence d'E.D.T.A. les sels ferriques formés à pH neutre précipitent sous forme d'oxyde ferrique.

CIER et NOFRE (16) ont proposé aussi d'augmenter la vitesse de formation du radical hydroxyle par l'emploi, avec le réactif, d'une substance réductrice comme l'acide ascorbique, qui joue le rôle d'un agent co-réducteur, en transformant l'ion ferrique en ion ferreux suivant la réaction :

$$H_2A + 2\,Fe^{3+} \longrightarrow 2\,Fe^{2+} + A + 2\,H^+$$

Ceci permet la recyclisation plus rapide des réactions de l'ion ferreux avec le peroxyde d'hydrogène.

Influence d'autres ions métalliques. CIER et NOFRE (16) ont montré que d'autres ions de la série de transition, notamment le cuivre, le manganèse, le cobalt peuvent réagir de la même façon que l'ion ferreux dans la décomposition catalytique du peroxyde d'hydrogène. On peut schématiser la réaction de la façon suivante :

$$HOOH + Me^{(n-1)+} \longrightarrow Me^{n+} + HO^- + HO.$$

où Me représente l'ion métallique considéré.

Ces auteurs ont montré que la chélation par l'E.D.T.A. de sels cuivreux inhibait leur pouvoir catalytique. Donc la chélation par l'E.D.T.A. des sels ferreux exalte leur propriété catalytique, et la chélation des sels cuivreux, au contraire, inhibe ces propriétés.

Les effets catalytiques sont potentialisés par l'acide ascorbique, en particulier pour le cuivre où cette potentialisation devient supérieure, dans ces conditions, à celle du fer.

Activation de l'oxygène moléculaire

Autoxydation des ions métalliques. (Réactif d'UDENFRIEND (85)) Ce mécanisme ne diffère de celui de FENTON que par l'étape initiale, où par réaction entre les ions métalliques de la série de transition et l'oxygène moléculaire (autoxydation), il y a formation de peroxyde d'hydrogène.

Ce mécanisme est maintenant bien établi par CIER et NOFRE (16), NOFRE et CIER (63), WEISS (90).

Il y a transfert d'un électron de l'ion métallique sur la molécule d'oxygène, avec formation d'un complexe ionique mononucléaire :

$$Me^{(n-1)+} + O_2 \longrightarrow (Me^{n+} O_2^-)$$

Ce complexe peut réagir avec un autre ion métallique, suite à un nouveau transfert d'électron, en donnant un complexe binucléaire :

$$(Me^{n+}\,O_2^{-}) \quad + \quad Me^{(n-1)+} \longrightarrow \quad (Me^{n+}\,O_2^{\,2-}\,Me^{n+})$$

Ce complexe est instable, et, par collision avec une molécule d'eau solvante, conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène :

$$(Me^{n+}\,O_2^{2-}\quad Me^{n+}) \xrightarrow{2\,H^+} HOOH \quad + \quad 2\,Me^{n+}$$

Le peroxyde d'hydrogène, au contact d'un ion métallique réduit, se scinde alors suivant une réaction de FENTON en libérant le radical hydroxyle.

L'oxygène moléculaire, ne pouvant subir de dissociation hétérolytique spontanée, ne pourra réduire par lui-même les ions métalliques oxydés comme le fait le peroxyde d'hydrogène ; la réaction sera de ce fait limitée. En présence d'acide ascorbique, comme dans le cas du réactif de FENTON, on obtiendra une recyclisation des réactions. C'est par ce mécanisme qu'on explique actuellement (16), (63) les propriétés oxydantes du réactif d'UDENFRIEND (85), ce réactif qui est composé d'une solution d'un mélange acide ascorbique - E.D.T.A. ferreux en présence d'oxygène moléculaire et qui est bien connu aujourd'hui en tant que système générateur du radical libre hydroxyle (CIER et NOFRE (16), NOFRE et CIER (63), ACHESON et HAZELWOOD (1), BRESLOW et LUKENS (11).).

LES EFFETS CHIMIQUES DES SYSTEMES GENERATEURS DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

Réaction d'oxydo-réduction. Les radicaux libres, grâce à leur électron célibataire, sont des entités chimiques très actives. Ils pourront par exemple arracher un électron aux ions ou molécules en se transformant en ion hydroxyle :

$$H : \ddot{O}\,. \quad + \quad e^- \longrightarrow \quad H : \ddot{O} : ^-$$

C'est, parmi les agents d'oxydation connus, l'un des plus puissants.

Attaque des molécules organiques. En présence de substrats organiques (R - H), l'une des réactions principales est leur attaque homolytique avec hydroxylation, conformément aux réactions suivantes :

$$R - CH_3 + HO. \longrightarrow R - CH_2. + HOH$$

$$R\ CH_2. + HO. \longrightarrow R - CH_2OH$$

C'est ainsi qu'il a été montré que les biomolécules essentielles comme les acides aminés (67), les stéroïdes (64), les bases puriques (66) ou pyrimidiques (15) constituants fondamentaux des acides nucléiques, peuvent subir sous l'action du radical libre hydroxyle des dégradations oxydatives très poussées.

LES EFFETS BIOLOGIQUES DES SYSTEMES CHIMIQUES GENERATEURS DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

Des études récentes ont montré que les systèmes chimiques générateurs du radical hydroxyle peuvent avoir des effets biologiques importants.

Effets génétiques. PHILLIPS (73) a constaté que la répartition des ruptures chromosomiques sous l'action du réactif de FENTON est identique à celle que provoquent les radiations ionisantes. De même DUBININ et Coll. (39) ont observé diverses similitudes dans les perturbations chromosomiques produites par le réactif de FENTON et par les radiations. Il a été montré, en outre, que le réactif de FENTON est un agent mutagène chez les bactéries (23, 24). LWOFF (57) a montré que l'acide ascorbique et le peroxyde d'hydrogène en présence d'ion cuivre, sont susceptibles d'induire, comme le font les radiations, la bactériophagie chez les bactéries lysogènes.

Effets radiomimétiques chez les mammifères. Il a été également constaté que les systèmes chimiques hydroxylants pouvaient créer des effets radiomimétiques chez les mammifères comme l'ont montré BOYLAND et SARGENT (10) et plus récemment NOFRE, CIER et PAQUELIER (65).

Effets virulicides et bactéricides. La sensibilité apparente des virus au peroxyde d'hydrogène est connue depuis longtemps. Dès 1910, LANDSTEINER et LEVADITI (51) l'avaient déjà remarqué dans le cas du virus poliomyélitique qui venait d'être découvert. On l'a noté ensuite pour le virus de la mosaïque du tabac (STANLEY (81)), le virus de l'encéphalomyélite de la souris (THEILER et GARD (84)). Dans une revue d'ensemble sur l'activité virulicide de nombreux produits chimiques, SCHULTZ et ROBINSON (78) classent le peroxyde d'hydrogène parmi les produits ayant une activité valable.

LATARJET (52), plus récemment, a montré que des hydroperoxydes et des peracides avaient également un effet inactivant. Quant aux propriétés bactéricides du peroxyde d'hydrogène, elles sont beaucoup plus discutées, DORVAULT (27) signale que, d'après WALLENFELS, les diverses espèces bactériennes présentent à son égard de grandes différences de sensibilité. C'est d'autre part au peroxyde d'hydrogène formé par oxydation de l'acide ascorbique que LWOFF et MOREL (58) ont rapporté l'activité bactéricide de cette substance.

L'acide ascorbique qui, lui, est un corps réducteur, a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Dès 1935 JUNGEBLUT (45, 46), notait une activité importante sur le virus poliomyélitique, HOLDEN et RESNICK (43), HOLDEN et MOLLOY (42) sur le virus de l'herpès, LOJKIN (56) sur le virus de la mosaïque du tabac, KLIGER et BERNKOPF (50) sur le virus de la vaccine, KLEIN (49) sur le virus de la grippe. Plus récemment ERICSSON et LUNDBECK (34) signalaient l'activité de l'acide ascorbique sur le virus poliomyélitique, MAXWELL (59) sur le bactériophage. Il est d'autre part intéressant de noter que l'acide ascorbique témoigne une activité bactéricide marquée comme l'ont montré depuis longtemps GAGYI (36), GROTTEN et BEZSSONOFF (40), LWOFF et MOREL (58). Les parasites n'échappent pas non plus à cette activité comme l'ont établi STRANGEWAYS (83) dans le cas de Trypanosoma rhodesienne, ERICSSON et LUNDBECK (34) pour les champignons des genres Candida et Torulopsis.

Les premières publications se bornent en général à constater cette action toxique de l'acide ascorbique, seuls quelques auteurs ont tenté d'expliquer le phénomène en l'attribuant à la formation de peroxyde d'hydrogène au cours de l'autoxydation de l'acide ascorbique. C'est par ce mécanisme que LWOFF (57) explique l'activité bactéricide et la capacité d'induction des phages par les substances réductrices, notamment par l'acide ascorbique. Mais LOJKIN (56), puis ERICSSON et LUNDBECK (34) ont fait remarquer que les quantités de peroxyde d'hydrogène formées par ce mécanisme sont de loin inférieures à celles indispensables pour que cette substance manifeste quelque activité bactéricide et virulicide.

Tout récemment PELOUX, NOFRE, CIER et COLOBERT (71), COLOBERT, MONTAGNON, NOFRE et CIER (19) reprirent ces études et montrèrent, tant sur le virus poliomyélitique que sur E. coli, que les propriétés virulicides et bactéricides du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide ascorbique n'étaient dues qu'à la présence nécessaire d'ions métalliques à l'état de traces et relevaient essentiellement de la génèse du radical libre hydroxyle par activation catalytique du peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène moléculaire. Il a été montré par ces mêmes auteurs que l'association acide ascorbique-ion cuivre présentait, parmi les différents systèmes chimiques étudiés, les propriétés virulicides et bactéricides les plus actives.

LES INHIBITEURS DES SYSTEMES CHIMIQUES GENERATEURS DU RADICAL LIBRE HYDROXYLE

Le rôle essentiel, joué par les ions métalliques de la série de transition, dans la formation des radicaux libres, donne la possibilité d'inhiber cette dernière en chélatant les ions. On peut prévoir également que l'addition de corps à propriétés anti-oxygènes, autoxydables, en s'emparant de l'oxygène, limite l'émission des radicaux libres. Il est d'autre part possible de limiter les effets chimiques des radicaux libres formés par addition de substances à propriétés antioxydantes constituant pour ces derniers un substrat préférentiel.

- Les agents chélateurs. Un agent chélateur est un dérivé susceptible de donner des liaisons polyvalentes avec un ion métallique ; le produit qui en résulte est appelé un chélate. La stabilité d'un chélate est définie par sa constante de stabilité K. Plus cette constante de stabilité (ou sa valeur logarithmique) est élevée, plus le chélate sera stable, et donc difficilement dissociable. Dans le tableau I nous avons porté les logarithmes des constantes de stabilité de différents dérivés organiques avec l'ion cuivre, valeurs empruntées à la compilation donnée par CHABEREK et MARTELL (14).

	Logarithme de K
histidine	18,33
glycocolle	8,62
acide citrique	14,20
E.D.T.A.	18,40
cystéine	19,20

TABLEAU I

- Les antioxygènes et les antioxydants. La deuxième classe de produits que nous avons définie comprend les antioxygènes et les antioxydants, dont certains se révèlent d'excellents agents radioprotecteurs par inhibition des radicaux libres radioformés. Parmi ces produits, nous avons des dérivés minéraux comme l'hydrosulfite de sodium, des dérivés organiques comme la cystéine, la mercapto-2 éthylamine (M.E.A.), le dibromhydrate d'aminoéthylisothiouronium (A.E.T.) dont l'activité radio-protectrice se manifeste seulement à des pH voisins de la neutralité. DOHERTY (D.G.) et Coll. (25, 26) expliquent l'activité de l'A.E.T. par la transformation de ce produit en mercaptoéthylguanidine (M.E.G.) ; ce serait précisément ce dernier produit qui possèderait d'importantes propriétés radioprotectrices.

STAPLETON (G.) (82) a étudié l'activité radioprotectrice de ces produits sur E. coli irradié avec des rayons X. Il a évalué cette activité en déterminant pour plusieurs d'entre eux leur coefficient de réduction de dose (C.R.D.) qui exprime le rapport entre la dose d'irradiation qui provoque une inhibition donnée des bactéries en présence d'un agent radioprotecteur et la dose qui provoque la même inhibition sur les mêmes bactéries sans agents radioprotecteurs (bactéries non protégées). Ceci est objectivé dans le tableau II.

Agents radioprotecteurs	C R D
hydrosulfite de sodium	4,5
cystéine	4,5
mercapto-2 éthylamine (M.E.A.)	8-12
mercapto éthyl guanidine (M.E.G.) (produit de transformation de l'A.E.T. à pH 7)	8-10

TABLEAU II

Ce tableau montre par exemple qu'il faut une dose d'irradiation 4,5 fois plus forte sur des bactéries protégées par la cystéine pour obtenir le même effet que sur des bactéries non protégées.

A la lumière de travaux récents on peut émettre quelques hypothèses sur le mécanisme de cette radioprotection. La première, soutenue par DALE (W.) (21), par ALEXANDER (P.) et Coll. (3), semble faire jouer au radioprotecteur un rôle antioxydant par la compétition du radioprotecteur avec la biomolécule cible vis à vis du radical libre hydroxyle engendré par la radiolyse de l'eau. D'autres auteurs comme

PATT (H.M.) (69), BACQ (Z.M.) et ALEXANDER (P.) (4, 5) attribuent au radioprotecteur un rôle antioxygène pouvant induire une hypoxie cellulaire et inhibant de ce fait la peroxydation des biomolécules radicalisées.

En ce qui concerne les radioprotecteurs à groupements thiols, différents auteurs (32) (75) pensent qu'il y aurait formation d'un disulfure mixte entre le radioprotecteur et les protéines soufrées, composé dont les propriétés particulières amèneraient une protection efficace de la protéine soufrée.

A la lumière de ces travaux, nous avons recherché si le système chimique générateur du radical hydroxyle, composé d'acide ascorbique associé au cuivre, pouvait être utilisé dans un but pratique à l'épuration biologique des eaux d'alimentation. C'est ce qui va faire l'objet de la deuxième partie de ce travail.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

TECHNIQUES ET METHODES

Dans une première partie nous étudierons les techniques employées pour évaluer l'effet bactéricide, dans une deuxième nous exposerons les méthodes utilisées pour étudier l'effet virulicide.

EVALUATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE

- Choix de la bactérie d'épreuve. Nous avons utilisé Escherichia coli comme germe d'épreuve puisqu'on le considère par excellence comme la bactérie témoin de la pollution fécale et qu'il présente vis-à-vis des antiseptiques une résistance moyenne.

- Préparation d'une suspension normalisée. A l'aide d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose inclinée, on fait une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile ; cette suspension est ajustée au photomètre JOBIN et YVON tricellules de façon à correspondre à 5×10^8 bactéries par ml (40 divisions du tambour dans le cas d'une cuve de 1 cm d'épaisseur).

A partir de cette suspension ajustée, des dilutions dans l'eau distillée stérile sont faites de dix en dix jusqu'à 10^{-8}. On ensemence respectivement cinq boîtes de gélose avec 0,1 ml de chaque dilution. Après 24 heures d'incubation à 37° on dénombre les colonies. Pour contrôle, la même expérience est répétée trois fois.

Nous avons choisi arbitrairement cent bactéries par ml c'est à dire une concentration supérieure à ce que l'on peut rencontrer habituellement dans des eaux souillées. Toutes les expériences ont été réalisées dans une eau de source provenant du mont Cindre, très calcaire, dont le pH est voisin de 8 après stérilisation.

Cinq cents centimètres cubes de cette eau de source sont préalablement stérilisés dans une fiole conique d'un litre. On y introduit 10 ml de la suspension bactérienne en eau distillée titrant 5000 bactéries par ml. On obtient ainsi une suspension titrant 100 bactéries par ml. Le contenu du flacon conique est agité continuellement à l'aide d'un agitateur magnétique, ce qui assure l'oxygénation et l'homogénéisation.

Les réactifs sont ensuite apportés soit en solution pour le sulfate de cuivre, soit en poudre pour l'acide ascorbique. La manipulation est conduite à la température du laboratoire, comprise entre 20 et 22°C.

- Mesure du pouvoir bactéricide. Des prélèvements de la suspension bactérienne sont effectués 10, 30, 60 minutes après l'addition des réactifs.

Un prélèvement témoin est effectué avant l'apport des réactifs.

Pour mesurer l'activité bactéricide, on détermine donc en fonction du temps le nombre de bactéries en présence ou en l'absence des substances étudiées. Pour déterminer cette variation avec quelque précision, on a fait appel à une méthode statistique qui dérive directement de la méthode classique des dilutions utilisée pour titrer un virus. Ainsi pour étudier un prélèvement bactérien, on réalise une série de dilutions géométriques de raison 1/2. On ensemence huit échantillons de 1 ml de chacune de ces dilutions dans 3 ml d'eau peptonnée à 50 °/°° de pH 7,2. Après 24 heures d'incubation à 37°, on dénombre pour chaque dilution le nombre de tubes demeurés stériles et le nombre de tubes où Escherichia coli s'est développé. Après calcul des totaux cumulatifs suivant la méthode de REED et MUNCH (76) (BONET - MAURY, JUDE et SERVANT (9)), on reporte les résultats sur un papier quadrillé en logarithmes des dilutions et probits, qui permet de lire le logarithme de la dilution à laquelle il faudrait théoriquement procéder pour qu'un prélèvement de 1 ml ait 50 chances sur 100 de contenir au moins une bactérie. Le titre de la suspension bactérienne est exprimé par l'inverse de ce logarithme que nous désignons dans ce mémoire par le symbole $\log_{10}$ NP 50 (logarithme du nombre probable 50 pour 100).

Cette méthode permet de déterminer facilement la limite de confiance qui, dans les conditions de nos expériences, est de 0,1 $\log_{10}$.

- Evaluation de la durée d'activité. Nous avons été amenés à préciser vis à vis d'E. coli la rémanence de nos systèmes. Pour cette étude les réactifs considérés étaient introduits dans cinq fioles coniques d'un litre contenant cinq cents ml d'eau de source stérile, les bactéries étant ajoutées respectivement 1 heure, 2 heures, 3 heures, 5 heures, 24 heures après l'introduction des réactifs. Le titrage des bactéries est ensuite réalisé comme précédemment 10, 30, 60 minutes après leur introduction.

EVALUATION DE L'ACTIVITE VIRULICIDE

- Choix du virus d'Epreuve. Nous avons utilisé comme virus d'Epreuve le virus poliomyélitique souche MAHONEY I c'est à dire la souche utilisée par PELOUX, NOFRE, CIER et COLOBERT (71) dans leur étude de l'activité virulicide des systèmes hydroxylants. La suspension mère étant constituée par le liquide surnageant d'une culture en milieu LEPINE et Coll. (53) mais sans addition de sérum, de cellules K.B. cultivées à 37° et récoltées quatre jours après l'inoculation. Cette suspension est mise en ampoules scellées et conservées à plus 4° C.

- Titrage de la suspension mère de virus. Le titre de la suspension mère est périodiquement déterminé. La suspension de virus est diluée de dix en dix jusqu'à 10^{-9}.

Des tubes de cellules K.B. de trois jours sont vidés de leur milieu et on inocule 0,1 ml de chaque dilution à raison de six tubes par dilution. On abandonne vingt minutes à la température du laboratoire avant d'ajouter 2 ml de milieu LEPINE sans sérum.

Les tubes sont ensuite placés à l'étuve pendant 48 heures. Au bout de ce temps on dénombre les tubes dans lesquels l'effet cytopathogène s'est manifesté ; les résultats sont ensuite exprimés par la méthode des totaux cumulatifs, puis portés sur un papier logprobabilité, ce qui permet de déterminer graphiquement la $D.I._{50}$ (dose infectieuse 50 pour 100). Habituellement la suspension virale mère titre de 10^{+6} à 10^{+7} $D.I._{50}$ par ml.

- Préparation d'une suspension virale contenant 1 000 $D.I._{50}$ par ml. Pour obtenir une suspension contenant 1 000 $D.I._{50}$ par ml, nous diluons la suspension mère dans l'eau de source stérile de façon à obtenir 10 000 $D.I._{50}$ dans un volume de 9 ml. Après l'introduction des divers réactifs sous 1 volume de 1 ml, la suspension virale titre donc 1 000 $D.I._{50}$ par ml.

Au moment de l'emploi, la température de cette suspension virale est ajustée à 30° C à l'aide d'un bain-marie agité.

Un tube témoin est préparé dans les mêmes conditions ; les réactifs étant remplacés par 1 ml d'eau de source stérile.

- Mesure du Pouvoir virulicide. Nous faisons d'abord un prélèvement dans le tube témoin, puis dans le tube expérience des prélèvements sont effectués 10, 30, 60 minutes après l'addition des réactifs à étudier.

Le titrage de chacun de ces prélèvements du virus capable de provoquer des lésions cytopathogènes est effectué par la même méthode que précédemment. Les dilutions sont faites de 1/2 en 1/2 ce qui nous permet de déterminer le titre avec une précision de $\mp$ 0,3 $\log_{10}$. Les résultats sont donc finalement exprimés en $D.I._{50}$ par ml. Portés sur un graphique en fonction du temps, ils expriment la cinétique d'inactivation du virus.

Etant donné la difficulté dans un délai de vingt minutes de réaliser les titrages par ce procédé, nous avons été amenés à nous contenter de la méthode suivante :

Nous avons mis à profit le pouvoir chélateur vis à vis du cuivre, du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique, qui a pour effet d'arrêter immédiatement et définitivement la génération de radicaux libres. Nous avons donc opéré avec une suspension virale titrant 10 000 $D.I._{50}$ par ml c'est à dire dix fois plus concentrée que nous l'avions décrite précédemment. Pour chaque titrage, on prélève 1 ml de la suspension virale dans 9 ml d'une solution stérile 0,05 mM du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique, ce qui amène le titre final à 1 000 $D.I._{50}$ par ml. Cette suspension virale peut être conservée quelques heures sans crainte de voir l'inactivation du virus se poursuivre. Le titrage est réalisé comme il a été décrit précédemment.

REACTIFS UTILISES

a) Solution de sulfate de cuivre. Nous avons utilisé une solution de sulfate de cuivre à 10 micromoles par ml. Cette solution est mise en ampoules scellées.

b) L'acide ascorbique a été utilisé sous forme de poudre, ses solutions n'étant pas stables.

CHAPITRE II

RECHERCHE DES CONCENTRATIONS RELATIVES D'ACIDE ASCORBIQUE ET DE SULFATE DE CUIVRE CONSTITUANT UN SYSTEME ACTIF

Par convention, on a recherché les concentrations minima de réactifs capables de détruire totalement en dix minutes, en milieu aéré et agité, 100000 E. coli et 10^7 $D.I._{50}$ de virus poliomyélitique par litre.

Nous avons pris soin de vérifier que, dans les conditions de nos expériences, le titre des suspensions bactériennes et virales ne diminue pas de manière significative.

ACTIVITE BACTERICIDE ET VIRULICIDE DE L'ACIDE ASCORBIQUE UTILISE ISOLEMENT

Plusieurs auteurs ont déjà attribué à l'acide ascorbique des propriétés bactéricides et virulicides importantes. En 1942 SPINCK, AGNEW et MICKELSEN (80) montrent que l'acide ascorbique augmente le pouvoir bactéricide du sérum humain. En 1945 KLEIN (49) essaie d'expliquer le pouvoir virulicide de ce produit par son oxydation. Plus tard, ERICSSON (33) observe que l'acide ascorbique précipite le mucus salivaire et possède un pouvoir bactéricide important sur les germes de la bouche. MYWICK, WEISSER, HOUGLUM et BERGER (61) en 1954 constatent un certain pouvoir bactéricide de la vitamine C sur le bacille tuberculeux et l'expliquent par l'oxydation de ce produit. De fait, nous avons retrouvé cette activité et démontré le rôle essentiel des ions métalliques à l'état de traces.

Entre les concentrations de 200 µM et 1000 µ M nous avons constaté une diminution importante du titre des bactéries et des virus pendant les trente premières minutes de contact, et une destruction totale en une heure (voir figure 1).

Dans un premier temps, nous avons rajouté à l'eau du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique pour avoir une concentration finale de 0,05 mM avant l'addition des bactéries. L'activité de l'acide ascorbique se trouve ainsi considérablement diminuée (figure 2 B).

Dans une deuxième expérience, nous avons ajouté des bactéries traitées préalablement par l'E.D.T.A. Ca Na_2 de la façon suivante :

Une culture de 24 heures d'E. coli est mise en suspension dans 2 ml d'eau distillée stérile, auxquels on ajoute 2 ml d'une suspension d'E.D.T.A. Ca Na_2 pour avoir la concentration finale 0,05 mM, cette suspension est agitée 30 minutes à la température du laboratoire. Puis elle est centrifugée à 3000 tours/minute, et lavée deux fois à l'eau distillée stérile. Le culot des bactéries est remis en suspension dans l'eau distillée stérile, ajusté au photomètre Jobin et Yvon tricellules à 5 x 10^{+8} bactéries par ml (c'est à dire 40 divisions du tambour), puis dilué pour avoir une suspension finale à 100 bactéries par ml.

On apporte ensuite dans cette dernière suspension de l'E.D.T.A. Na_2 Ca, pour avoir la concentration finale 0,05 mM, avant d'ajouter l'acide ascorbique. Dans ce cas l'activité bactéricide de l'acide ascorbique a totalement disparu (figure 2 C).

Cette expérience montre bien le rôle essentiel, dans l'effet bactéricide de l'acide ascorbique, joué par des ions métalliques préexistant à l'état de traces dans les réactifs. L'addition d'E.D.T.A. inhibe fortement cette activité et la supprime complètement si les bactéries ont été préalablement traitées par le chélate calcique de l'E.D.T.A. ; ce dernier a le mérite de n'être pas toxique et de pouvoir encore fixer les ions tels que le fer et le cuivre qui déplacent le calcium. Cette suppression de l'activité bactéricide constitue d'ailleurs un argument pour que, dans le cas de l'acide ascorbique, se trouvent impliqués les ions cuivre plutôt que les ions fer. Si la participation de ces derniers était en cause, on aurait observé l'effet contraire, puisque la chélation du fer exalte la formation du radical libre HO.

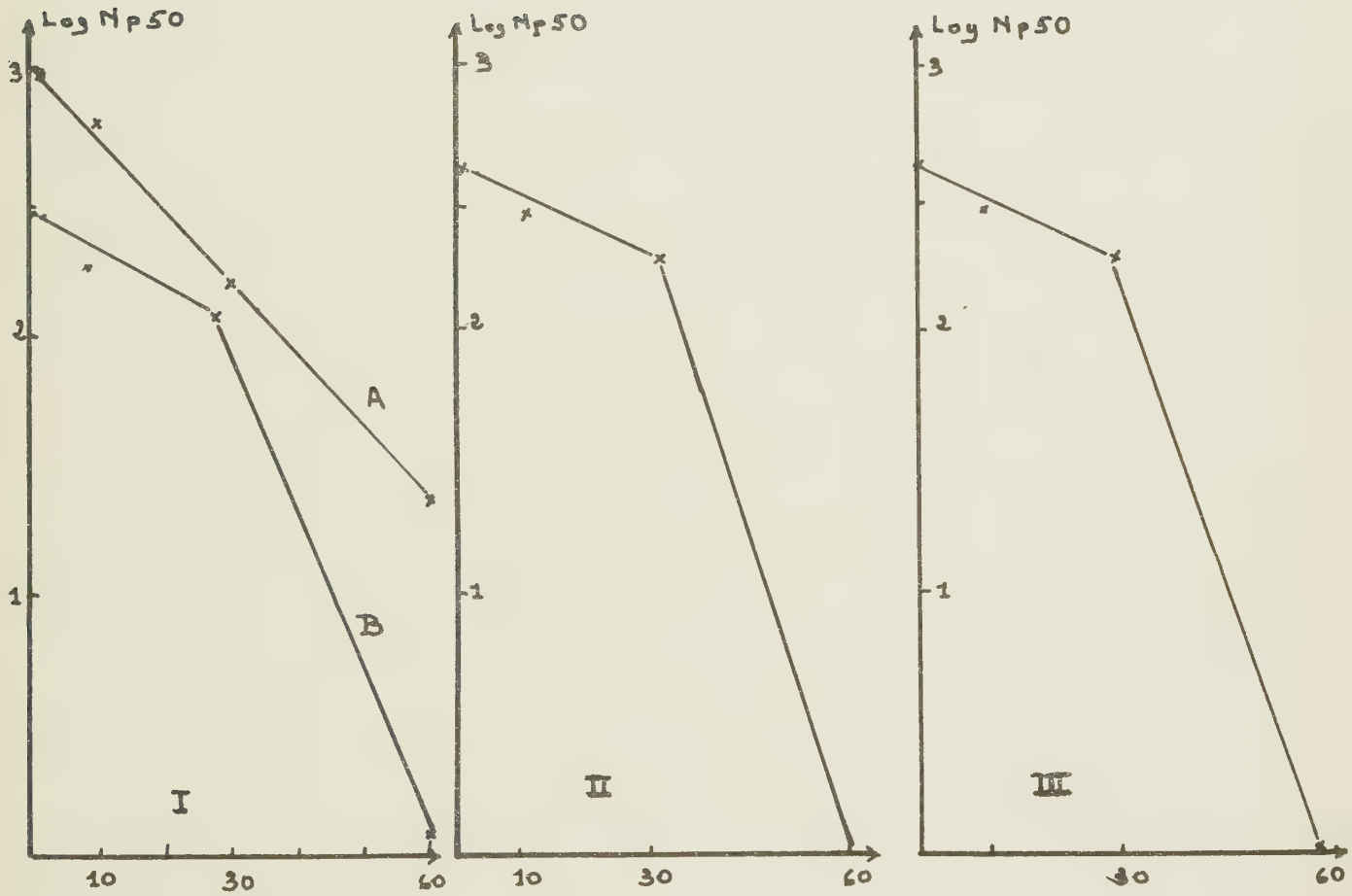


FIGURE 1 - ACTIVITE DE L'ACIDE ASCORBIQUE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS

Les figures I, II et III représentent respectivement des concentrations de 200 µ M, 400 µM, 1 000 µ M d'acide ascorbique. Les courbes A, B représentent respectivement les cinétiques d'inactivation du virus poliomyélitique et d'E. coli.

En abscisse, on porte le temps en minutes, en ordonnée le logarithme du Np. 50.

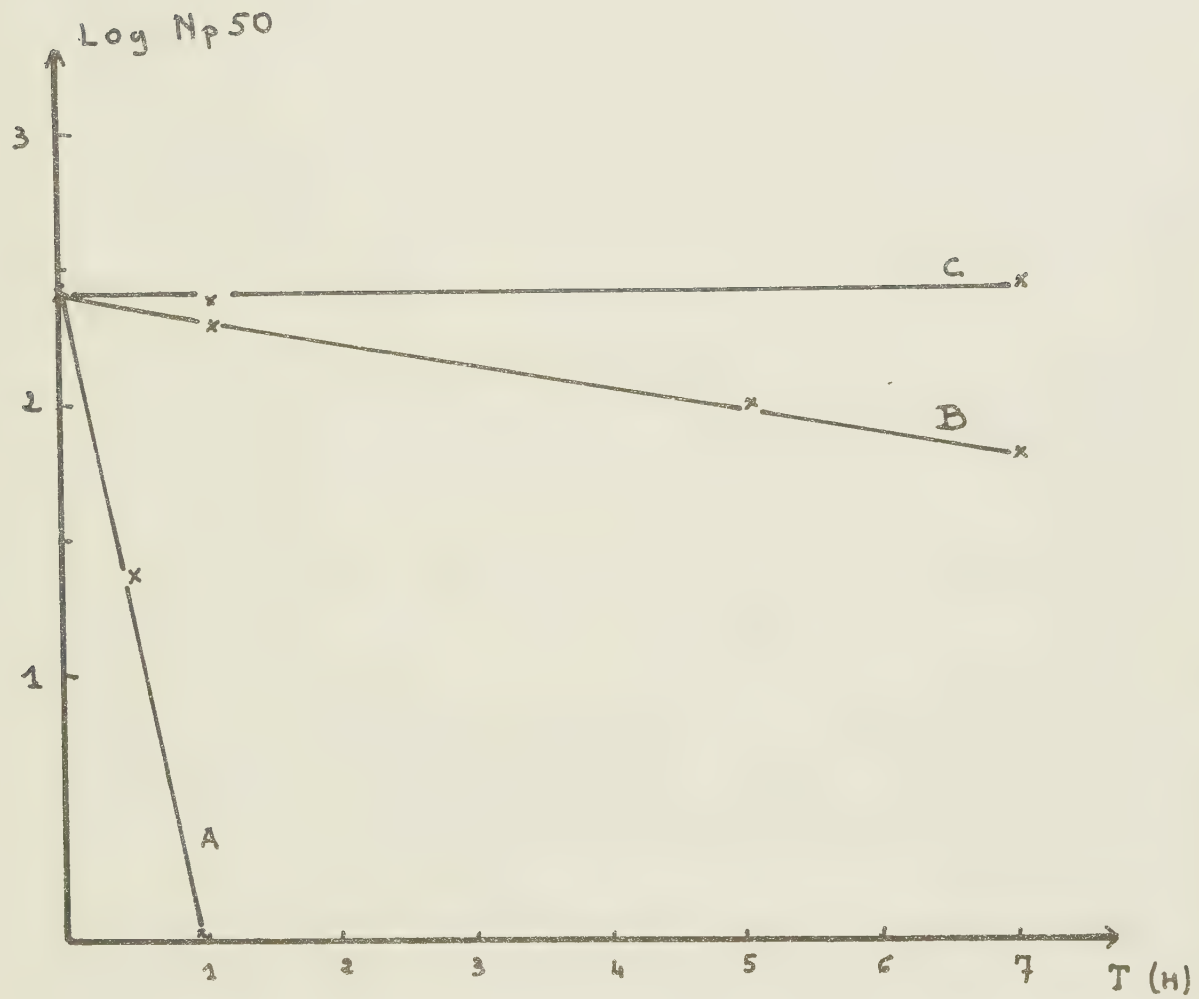


FIGURE 2 - INHIBITION DE L'ACTIVITE DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR L'E.D.T.A.

A, activité de l'acide ascorbique 200 µM utilisé isolément
B, activité après adjonction d'E.D.T.A. 0,5 mM
C, activité de l'acide ascorbique, 200 µM en présence d'E.D.T.A. sur E. coli préalablement traité par le chélate calcique de l'E.D.T.A.

ACTIVITE BACTERICIDE ET VIRULICIDE DU SYSTEME ASSOCIE ACIDE ASCORBIQUE - SULFATE DE CUIVRE

On a déterminé les doses d'acide ascorbique et de sulfate de cuivre les plus faibles possibles, capables d'exercer une activité assurant en dix minutes la destruction totale des bactéries et des virus. D'autre part, on a intérêt à ce que, autant que possible, le processus émetteur de radicaux libres soit épuisé dans ce même délai.

D'après les données théoriques, l'acide ascorbique donneur d'électron, régénère les ions cuivriques en ions cuivreux et, par le fait même, intensifie et prolonge la production de radicaux libres hydroxyles. Il convient donc d'utiliser des doses d'acide ascorbique les plus faibles possibles pour que l'activité du système ne se prolonge pas trop.

Quant au sulfate de cuivre, sa concentration doit être non seulement au-dessous des concentrations toxiques, mais au-dessous des limites admises comme normales dans une eau potable. Enfin, elles doivent être suffisamment basses pour ne pas conférer à l'eau une saveur métallique désagréable.

Toutes les expériences ont donc consisté à déterminer un rapport judicieux entre ces deux réactifs.

- Activité du système acide ascorbique (200 µM) sous l'influence de doses variables de sulfate de cuivre. Ces essais d'activité ont été d'abord étudiés vis à vis d'E. coli ; on a vérifié par la suite l'efficacité vis à vis du virus poliomyélitique des concentrations ainsi déterminées.

En ajoutant à de l'acide ascorbique 200 µM du sulfate de cuivre à 10 µM, la cinétique d'inactivation diphasique dans le cas de l'emploi de l'acide ascorbique seul, devient monophasique. On voit sur la figure 3 que les bactéries sont totalement détruites en moins de dix minutes.

En diminuant de dix fois la dose de sulfate de cuivre (acide ascorbique 200 µM avec 1 µM de sulfate de cuivre), on observe encore une activité intense mais incomplète en dix minutes (figure 4).

La concentration de 200 µM paraissant utilisable dans la pratique, on a étudié s'il était possible de diminuer la concentration en sulfate de cuivre. La figure 5 montre que pour une concentration en cuivre dix fois plus faible (0,1 µM) l'activité est encore importante mais cependant nettement inférieure.

En résumé, le système acide ascorbique 200 µ M sulfate de cuivre 10 µ M se montre capable d'assurer la neutralisation et la destruction en dix minutes des microorganismes introduits dans l'eau. Cependant la génération des radicaux libres n'est pas achevée dans ce délai. Sur la figure 6 A on voit qu'après cinq heures l'activité bactéricide est encore très importante puisque si, à ce moment, on introduit des bactéries, on note qu'en une heure 50 % de celles-ci sont détruites. Après 24 heures de contact des réactifs, l'activité bactéricide est extrêmement faible (figure 6 B).

- Activité du système acide ascorbique 100 µ M en fonction du sulfate de cuivre à concentrations variables. L'acide ascorbique se révélant très actif pour une concentration de 200 µ M, il est intéressant de voir s'il était possible de le diminuer sans perte d'activité considérable. D'après les données théoriques l'acide ascorbique se consommant dans la réaction, des concentrations plus faibles devraient permettre de raccourcir la durée d'émission de radicaux libres.

Ainsi, avec le système acide ascorbique 100 µ M, sulfate de cuivre 10 µ M, la totalité des bactéries est détruite en dix minutes. L'effet rémanent déjà très faible au bout de 3 heures est encore considérablement réduit au bout de cinq heures (figure 7 et 10).

Avec le système acide ascorbique 100 µ M sulfate de cuivre 5 µ M, la totalité des bactéries est détruite en dix minutes, mais non tous les virus (figure 8). Le système est encore actif après deux heures, mais faible au bout de trois heures.

Avec le système acide ascorbique 100 µ M sulfate de cuivre .1 µ M, les bactéries et les virus ne sont plus détruits en dix minutes (figure 9). Quant à l'effet résiduel, il est encore sensible au bout de 3 heures, mais faiblement au bout de 5 heures.

Il résulte de ces observations que seule la concentration de 10 µ M de sulfate de cuivre permet d'obtenir la stérilisation totale en 10 minutes, quand la concentration d'acide ascorbique est fixée à 100 µ M (figures 7 et 10).

- Activité du système acide ascorbique 50 µ M en fonction de doses variables de sulfate de cuivre. On a cherché à vérifier s'il était possible de diminuer l'effet rémanent en employant une concentration plus faible d'acide ascorbique.

Fig 3

Fig 4

Fig 5

FIGURES 3, 4, 5 - ACTIVITE BACTERICIDE ET VIRULICIDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE 200 µ M AVEC DES CONCENTRATIONS DE SULFATE DE CUIVRE VARIABLES

Les figures 3, 4, 5 représentent l'activité bactéricide et virulicide de 200 µ M d'acide ascorbique avec respectivement 10, 1, 0,1 µ M de sulfate de cuivre.

La courbe 3A représente la cinétique d'inactivation d'E. coli
La courbe 3B représente la cinétique d'inactivation du virus poliomyélitique.

En abscisse le temps en minutes, en ordonnée le log Np. 50.

Avec le système acide ascorbique 50 µM sulfate de cuivre 10 µM, comme précédemment toutes les bactéries sont détruites en dix minutes, mais les virus ne le sont pas (figure 11).

Comme on s'y attendait, l'effet rémanent au bout de trois heures est devenu plus faible que celui observé avec une concentration d'acide ascorbique double.

De plus on a constaté qu'il n'est pas possible d'obtenir la neutralisation totale du virus en 10 minutes en augmentant la teneur en cuivre, tout au moins dans les limites étudiées.

Il résulte de ces données que les concentrations d'acide ascorbique de 100 µM et 200 µM sont les plus judicieuses car elles permettent d'obtenir l'effet recherché à des concentrations très acceptables en sulfate de cuivre (10 µM). Il paraît finalement préférable de retenir la concentration la plus élevée en acide ascorbique (200 µM) ce qui permet de faire appel à une concentration faible de cuivre (5 µM), deux fois plus faible que celle donnée par l'O.M.S. comme normale dans l'eau potable. En pratique, nous avons adopté une concentration en cuivre légèrement supérieure. La formule finale est la suivante :

Acide ascorbique 200 µM, sulfate de cuivre 7,5 µM

- Etude de la formule adoptée. Avec ces concentrations (acide ascorbique 200 µM, sulfate de cuivre 7,5 µM), on observe une destruction totale des bactéries et des virus en 10 minutes, ce qui est conforme au but recherché. Quant à l'activité résiduelle, elle est très importante au bout de 2 heures, elle se manifeste encore faiblement au bout de 5 heures (figure 13).

RECHERCHE D'INHIBITEURS SUSCEPTIBLES D'INHIBER L'ACTIVITE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - SULFATE DE CUIVRE SUR E. COLI

L'eau de source ayant subi une épuration chimique par le système acide ascorbique - sulfate de cuivre est destinée à être consommée assez rapidement. Il paraît indispensable que la formation de radicaux libres soit achevée au moment de sa consommation. Or nous venons de voir qu'aux doses adoptées celle-ci se prolonge pendant cinq heures. Nous avons cherché à bloquer la génèse du radical libre hydroxyle, après une durée jugée suffisante pour assurer la désinfection de l'eau.

Nous avons donc cherché à déterminer les concentrations de différents produits (tant agents chélateurs, qu'anti-oxygènes ou anti-oxydants) pouvant empêcher la destruction des bactéries par le système acide ascorbique - sulfate de cuivre.

- Mode opératoire. Comme pour les expériences précédentes, on ajuste une suspension bactérienne à 100 bactéries par ml dans une fiole conique d'un litre.

Des prélèvements et titrages de bactéries présentes dans la suspension seront effectués avant et après l'introduction du système acide ascorbique - sulfate de cuivre en présence du produit inhibiteur.

- Résultats. Nous avons porté dans le tableau III les résultats les plus intéressants, correspondant aux concentrations de produit donnant 100 % d'inhibition du système acide ascorbique - cuivre.

Nature du Produit	Concentration du produit pour avoir 100 % d'inhibition en (μ M) à pH 7,22
Chélateurs	
Histidine	7,5 μM
E.D.T.A. disodique	7,5 μM
Cystine	7,5 μM
Glycocolle	100 μM
Acide citrique	400 μM
Anti-oxygènes	
Hydrosulfite de sodium	200 μM
M.E.A.	50 μM
A.E.T.	100 μM (activité diminuée à pH 8,2 et 6,6)
Chélateur et anti-oxygène	
Cystéine	7,5 μM

TABLEAU III

Fig. 7

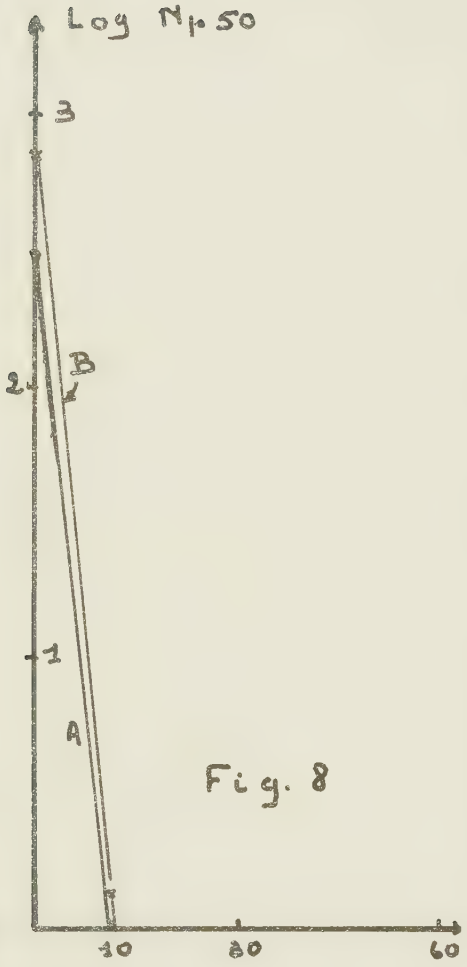


Fig. 8

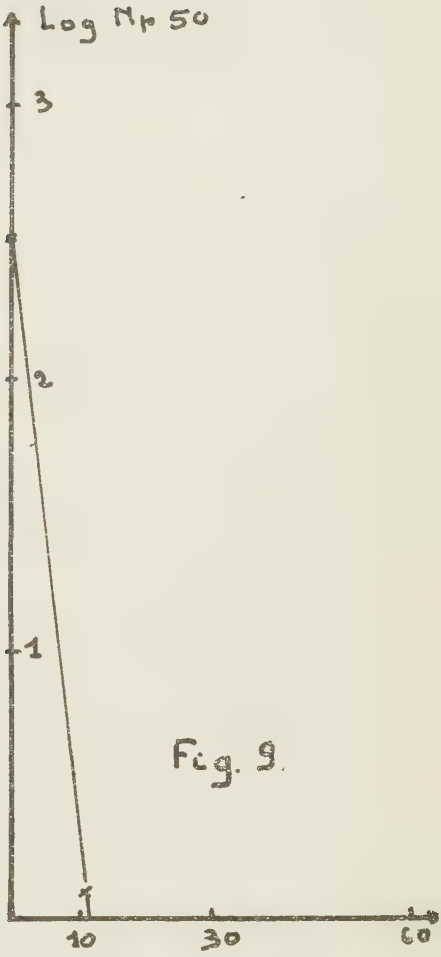


Fig. 9

FIGURES 7, 8, 9 - ACTIVITE BACTERICIDE ET VIRULICIDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE 100 µ M POUR DES CONCENTRATIONS VARIABLES DE SULFATE DE CUIVRE

Les figures 7, 8 , 9 représentent l'activité bactéricide et virulicide de 100 µ M d'acide ascorbique avec respectivement 10, 5, 1 µ M de sulfate de cuivre.

La courbe 8A représente la cinétique d'inactivation d'E. coli.
La courbe 8B représente la cinétique du virus poliomyélitique.

En abscisse le temps en minutes, en ordonnée le log du Np. 50.

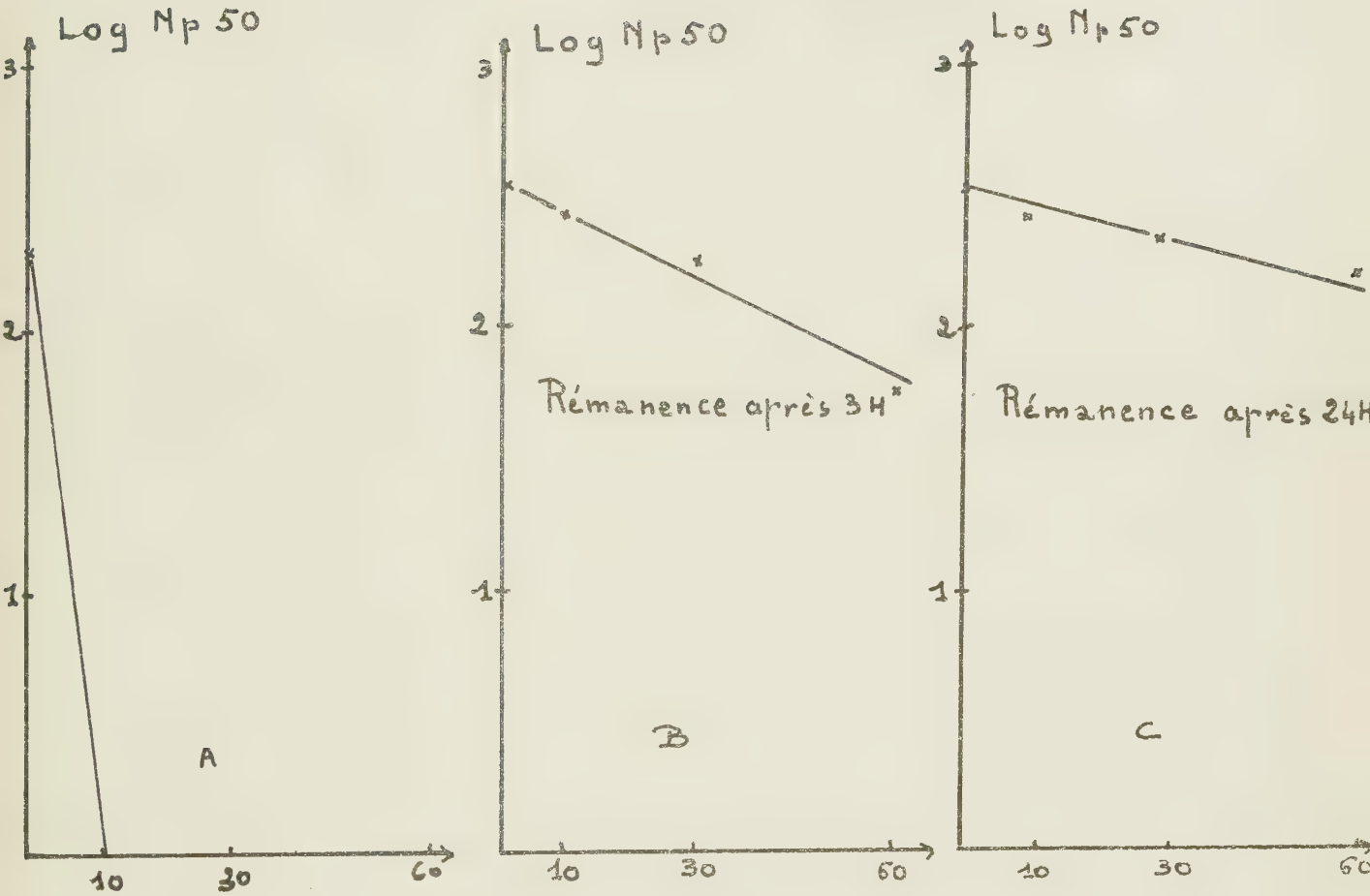
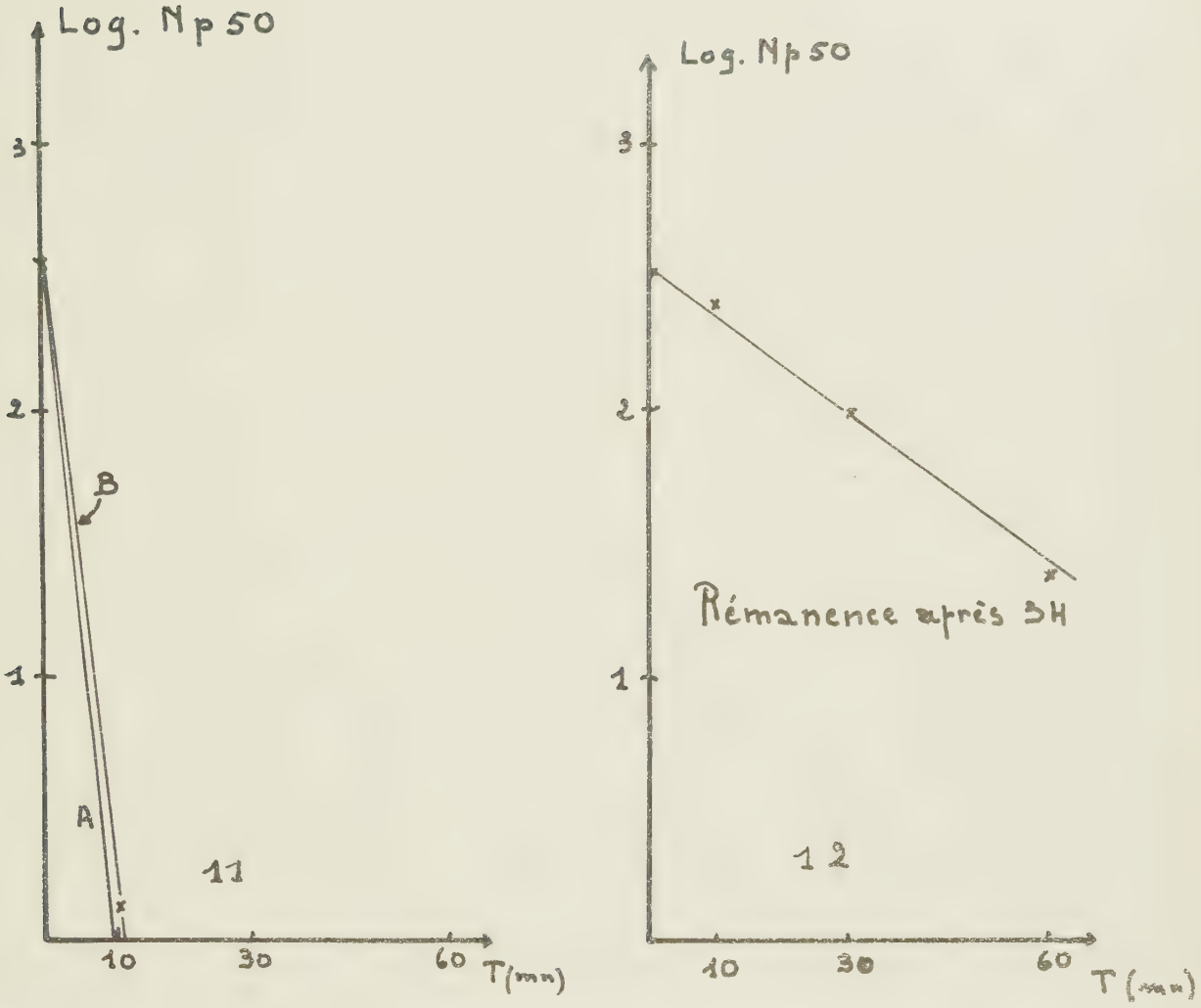


FIGURE 10 - ETUDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE 100 µ M, SULFATE DE CUIVRE 10 µ M

La figure 10A représente l'activité de ce système sur E. coli.
La figure 10B représente l'activité de ce système au bout de 3 h.
La figure 10C représente l'activité de ce système au bout de 24 h.

En abscisse le temps en minutes, en ordonnée le log du Np. 50.



FIGURES 11, 12 - ETUDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE 50 µM, SULFATE DE CUIVRE 10 µ M

La figure 11A représente la cinétique d'inactivation de E. coli, la figure 11B celle du virus poliomyélitique.

La figure 12 représente l'activité de ce système au bout de 3 h.

En abscisse le temps en minutes, en ordonnée le log du Np. 50.

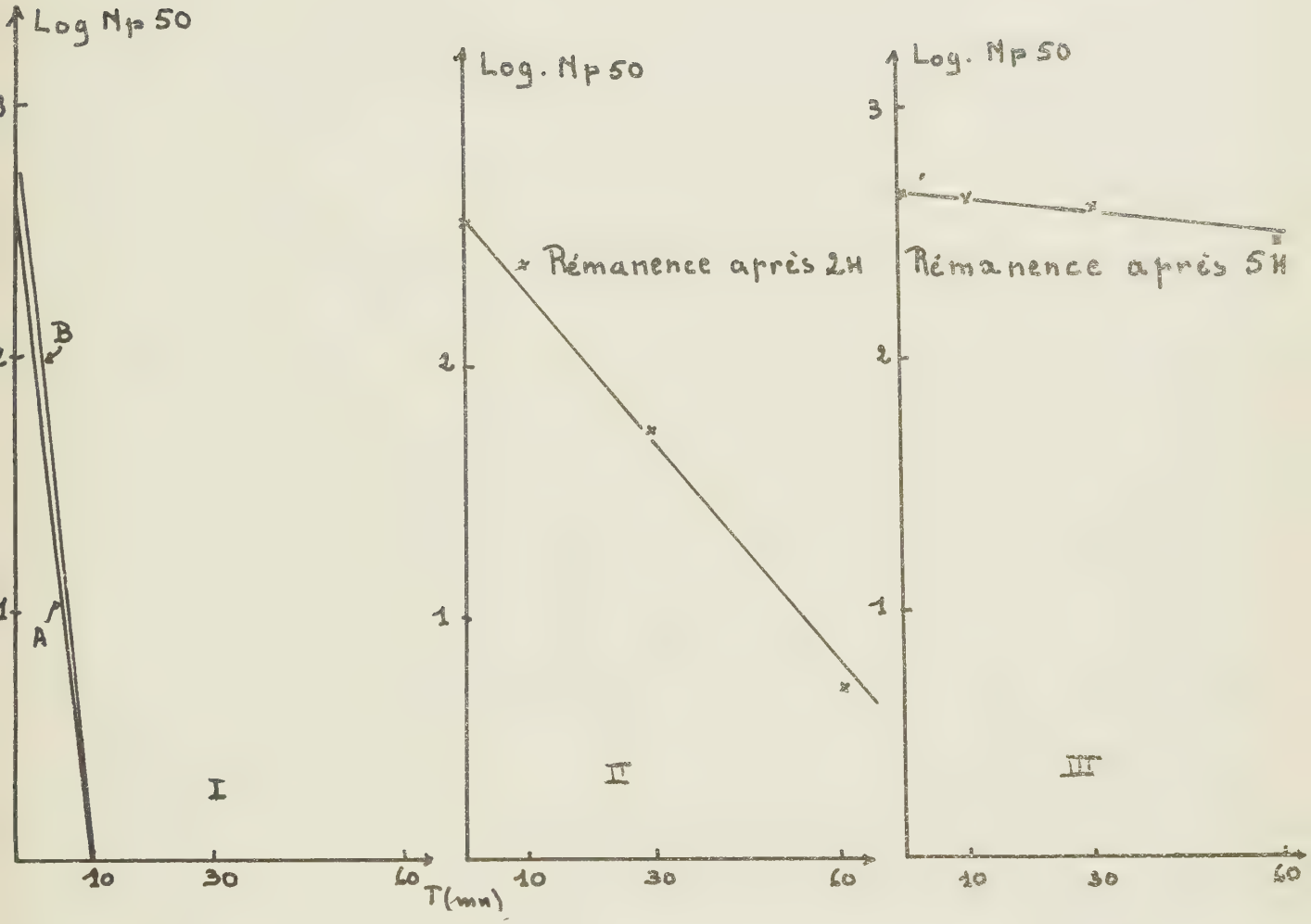


FIGURE 13 - ETUDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE 200 µM, SULFATE DE CUIVRE 7,5 µM

La figure 13 (I) représente l'activité bactéricide et virulicide, courbe 13 (I) A inactivation d'E. coli, courbe 13 (I) B inactivation du virus poliomyélitique.

La figure 13 (II) représente l'activité du système au bout de 2 h.
La figure 13 (III) représente l'activité de ce système au bout de 5 h.

CHAPITRE III

ETUDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - SULFATE DE CUIVRE SUR PLUSIEURS ESPECES BACTERIENNES ET SUR PLUSIEURS VIRUS

En dehors d'E. coli et du polio virus, nous avons vérifié l'activité du système acide ascorbique - sulfate de cuivre,

d'une part sur :

Streptococcus faecalis
Shigella flexneri
Salmonella typhi
Sarcina flava
Vibrio comma
Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis (spores)
Proteus vulgaris
Mycobacterium tuberculosis hominis

d'autre part sur :

le virus de la vaccine
le virus de l'herpès

ETUDE DE L'ACTIVITE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - SULFATE DE CUIVRE SUR LES DIFFERENTES BACTERIES

Techniques utilisées

En vue de simplifier la manipulation, nous nous sommes contentés de vérifier la stérilisation de l'eau contenant 10^6 bactéries par litre, 10 minutes après l'adjonction des réactifs.

On prépare une suspension de 1000 bactéries par ml dans 500 ml d'eau de source stérile, continuellement agitée par agitation magnétique et maintenue à la température du laboratoire. Avant l'introduction des réactifs on procède à un prélèvement témoin avec lequel on ensemence d'une part, 10 boîtes de gélose à raison de 0, 1 ml par boîte et d'autre part 10 tubes d'eau peptonée à 50 °/°° à raison de 1 ml par tube.

Les réactifs sont ensuite apportés et après 10 minutes de contact on prélève un échantillon avec lequel on ensemence d'une part, 10 tubes d'eau peptonée à 50 °/°° et d'autre part 10 boîtes de gélose.

La lecture des résultats peut être faite après 24 heures d'incubation à 37°.

Pour étudier l'activité sur les spores de Bacillus subtilis, on a procédé de la même manière sur une suspension de 100 spores par ml, obtenues par chauffage à 70° pendant 5 minutes d'une culture âgée.

Dans le cas de Mycobacterium tuberculosis hominis, on est parti d'une culture homogène en milieu de Dubos (30) d'une souche pathogène provenant d'une tuberculose humaine. Après quinze jours de culture à 37°, on détermine et ajuste le titre des suspensions par ensemencement, respectivement, de 6 tubes de milieu de Dubos pour chacune des dilutions sucessives de raison 1/10.

Résultats. On note la stérilisation de l'eau, à l'exception de celle ensemencée avec les spores de B. subtilis et de M. tuberculosis.

ETUDE DE L'ACTIVITE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - SULFATE DE CUIVRE SUR QUELQUES VIRUS

Virus de la vaccine. La souche que nous utilisons au laboratoire provient d'un vaccin anti-variolique lyophilisé, remis en suspension dans du milieu de LEPINE sans sérum et adaptée par plusieurs passages sur cellules K.B. en culture entretenue.

Le virus est ensemencé massivement sur cellules K.B. Lorsqu'après deux jours d'incubation à 37° la destruction cellulaire est obtenue, on procède à un broyage de la suspension. Le virus est ensuite titré par une méthode analogue à celle utilisée pour le virus poliomyélitique. Le titre habituellement obtenu est voisin de 10^4 $D.I._{50}$ par ml. Pour les essais, la suspension virale obtenue est diluée dans l'eau de source stérile de façon que le titre final soit de 10^3 $D.I._{50}$ par ml.

On a essayé successivement le système acide ascorbique 400 µ M - sulfate de cuivre 15 µ M et le système acide ascorbique 200 µ M - sulfate de cuivre 7,5 µ M. Dans les deux cas, aucun effet cytopathogène imputable au virus ne s'est manifesté après 48 heures d'incubation à 37°.

Virus herpétique. La souche utilisée est une souche adaptée au développement sur cellule K.B. L'incubation est pratiquée à 32°, comme le préconise LEPINE, au lieu de 37°.

Après centrifugation à faible vitesse, le surnageant de la culture constituera la suspension mère de titre habituel voisin de $10^{4,5}$ DI_{50} par ml. On introduit le virus dans l'eau de source stérile de façon à obtenir un titre final de $10^{2,5}$ DI_{50} par ml. Les techniques d'étude et de titrage utilisées sont toujours identiques à celles utilisées pour le poliovirus.

Le système acide ascorbique 200 µ M - sulfate de cuivre 7,5 µ M inactive totalement le virus de l'herpès en 10 minutes.

Le système acide ascorbique - sulfate de cuivre, aux concentrations adoptées, détruit totalement les bactéries et les virus considérés à l'exception des spores de Bacillus subtilis et du Mycobacterium tuberculosis.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR L'ACTIVITE BACTERICIDE ET VIRULICIDE DU SYSTEME ACIDE ASCORBIQUE - CUIVRE

Toutes nos expériences ont toujours été faites dans la même eau de source préalablement stérilisée. Il importait de préciser l'influence de divers facteurs, notamment de la présence de protéines qui sont souvent présentes dans les eaux souillées, l'influence de compositions minérales différentes, l'influence du pH.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PROTEINES

La présence fréquente de faibles quantités de protéines dans les eaux souillées, nous a amené à considérer leur action sur le système acide ascorbique - cuivre, d'autant plus que des auteurs comme NIADAS et ROBERT (62), SHAMRAI et Coll. (79) ont mis en évidence la possibilité de chélation du cuivre par les albumines de boeuf, d'une manière comparable à celle de l'acide éthylène diamine tétracétique. Pour les expériences qui vont suivre, nous avons utilisé de l'albumine humaine lyophilisée.

Mode opératoire. Dans 500 ml d'eau de source préalablement stérilisée, on dissout la quantité d'albumine, les bactéries (E. coli) sont ensuite apportées de manière à obtenir une suspension contenant 100 bactéries par ml. Un prélèvement témoin, sur lequel on effectue un titrage par la méthode classique des dilutions et totaux cumulatifs, est pratiqué avant l'addition des réactifs. Des prélèvements sont faits 10, 30, 60 minutes après l'addition de ceux-ci. Avec chaque prélèvement, on inocule 10 tubes d'eau peptonée à 50 °/°°, à raison de 1 ml par tube.

On procèdera à des expériences analogues avec des quantités croissantes de protéines (de 5 à 100 mg par litre).

Résultats. Jusqu'à 10 mg/l de protéines, l'activité du système demeure suffisante pour obtenir une stérilisation totale en 10 minutes.

Lorsqu'on atteint 25 mg/l, l'activité bactéricide du système est insuffisante pour provoquer en 10 minutes la stérilisation totale qui est cependant obtenue si l'on prolonge l'observation pendant 30 minutes.

Lorsqu'on atteint la concentration de 50 mg/l, le système acide ascorbique - cuivre ne manifeste plus d'activité, même si l'on prolonge l'observation pendant une heure.

INFLUENCE DE LA NATURE DE L'EAU

On a comparé l'efficacité du système acide ascorbique - cuivre aux concentrations adoptées, dans des eaux potables n'ayant subi aucun traitement d'épuration préalable et aussi différentes que possible. Nous avons utilisé des eaux de sources, de rivières, de puits, au total sept échantillons différents.

Mode opératoire. Les différents échantillons d'eau ont été prélevés dans des bouteilles en plastique, sans conditions spéciales de stérilité. Chaque échantillon a été disposé dans une fiole conique de 1 litre préalablement stérilisée.

On a pratiqué un prélèvement témoin avec lequel on a ensemencé 10 tubes d'eau peptonée, à raison de 1 ml/tube. Les bactéries (E. coli) sont ensuite apportées de manière à obtenir une suspension finale de 100 bactéries par ml, sur laquelle un deuxième prélèvement témoin est alors effectué. Après l'addition des réactifs bactéricides, (acide ascorbique - cuivre) on a fait des prélèvements aux temps de 10, 30, 60 minutes.

Ces différents échantillons avaient respectivement les pH suivants :

- eau prélevée à Collonges au Mont d'Or (Rhône) 8
- eau prélevée dans une rivière à Desaigne (Ardèche) 7,50
- eau prélevée à Chandieu (Isère) 7,30
- eau prélevée dans un puits à Desaigne (Ardèche) 6,85
- eau prélevée à Bonnevaux (Isère) 7,36
- eau prélevée à Epinal (Vosges) 6,20
- eau prélevée à Landousse (Hte Vienne) 5,90

Résultats. Dans tous les cas le système acide ascorbique - cuivre s'est montré capable de détruire non seulement les bactéries que nous avons ajoutées, mais en plus celles présentes à l'origine dans l'eau qui se trouve finalement totalement stérilisée.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN BACTERIES

Toutes les expériences décrites jusqu'ici ont été réalisées avec des quantités constantes de bactéries et de virus, à savoir 100 E.coli par ml, 10 000 D.I. 50 par ml de virus poliomyélitique. Il nous a paru intéressant de rechercher jusqu'à quelle limite l'activité bactéricide et virulicide se manifeste. On a admis, au point de vue pratique, qu'une durée de 10 minutes est acceptable pour obtenir l'épuration ; les essais ont donc consisté à vérifier, au bout de cette durée, la stérilisation de l'eau traitée.

Dans une première série d'essais, nous avons ajusté la teneur en bactéries à 100, 1000, 10000, 1 000 000 par ml. Parallèlement on a fait un essai témoin sur lequel on a effectué un titrage par la méthode des dilutions et totaux cumulatifs, afin de vérifier la concentration en bactéries. Les réactifs sont ensuite apportés et l'activité bactéricide est vérifiée après 10 minutes de contact. La stérilisation totale cesse d'être obtenue en 10 minutes pour des teneurs comprises entre 10 000 et 100 000 bactéries par ml.

Pour ce qui est des virus, nous avons procédé de même en préparant des suspensions titrant 10 000, 100 000 D.I. 50 par ml de virus poliomyélitique.

Aux concentrations adoptées, le système acide ascorbique - cuivre ne détruit pas totalement en 10 minutes 100 000 D.I. $_{50}$ de virus poliomyélitique.

ESSAIS D'UNE DOSE DOUBLE DE LA DOSE ADOPTEE

Nous avons tenu à vérifier la possibilité d'emploi d'une dose double de réactifs, c'est à dire aux concentrations de 400 μ M pour l'acide ascorbique, 15 μ M pour le sulfate de cuivre. On a constaté que dans ces conditions l'activité bactéricide est augmentée. Ainsi, lorsque la concentration de bactéries est de 100 000 bactéries par ml, si la stérilisation n'est pas atteinte en 10 minutes, elle l'est en 30 minutes, alors qu'avec la dose simple aucune destruction n'est encore manifestée en 30 minutes.

ESSAIS DE STERILISATION DE L'EAU DU RHONE

Pour nous rapprocher encore plus des conditions naturelles, nous avons vérifié l'activité du système sur l'eau du Rhône en crue. Cette eau étant trouble, nous l'avons laissée décanter quelques heures. L'eau du Rhône a été prélevée stérilement à 500 mètres environ en aval du pont de la Guillotière, en plein Lyon. L'analyse bactériologique a suivi le prélèvement de quelques heures ; le temps du transport au laboratoire et de la décantation des matières en suspension.

Les analyses bactériologiques comparées de cette eau, avant et après traitement, sont les suivantes :

	avant traitement	après traitement
- Nombre total de colonies sur gélose nutritive à 37°	300 par ml	5 par ml
- Streptococcus faecalis (sur milieu sélectif de COLOBERT et MORELIS (20)	120 pour 100 ml	0
- Escherichia coli (sur milieu au tergitol 7 suivant la technique de BUTTIAUX et Coll. (13) à 44°)	80 pour 100 ml	0
- Coliformes (sur milieu au tergitol 7 suivant la technique de BUTTIAUX et Coll. (13) à 37°)	innombrables	0
- Anaérobies sulfito-réducteurs	100 pour 100 ml	50 pour 100 ml
- Bactériophages coli	10 pour 100 ml	0
- Bactériophages shigella flexneri	1000 pour 100 ml	0

Etant donné ce que nous savons sur la résistance des spores au traitement, on pouvait penser que la résistance des 5 colonies dénombrées sur gélose nutritive à 37°, et des 50 anaérobies sulfito-réducteurs pour 100 ml, était imputable, en réalité à une sporulation. Cette hypothèse se trouve confirmée par le fait que le dénombrement de ces mêmes bactéries sur le même échantillon d'eau, mais chauffé, cette fois, pendant 5 minutes à 70°, nous donne sensiblement les mêmes résultats.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons montré dans la deuxième partie de ce travail que les propriétés antivirales et antibactériennes de l'acide ascorbique avaient été observées par de nombreux auteurs (33, 36, 40, 49, 61), mais elles n'avaient pas été rapportées, jusqu'aux travaux de PELOUX, NOFRE, CIER et COLOBERT (71), COLOBERT, MONTAGNON, NOFRE, CIER (19), à un processus radicalaire. Nos essais ont permis de constater effectivement les propriétés bactéricides et virulicides de l'acide ascorbique et le rôle essentiel d'ions métalliques tels que l'ion cuivre. Déjà ERICSSON et LUNDBECK (34) avaient montré que l'addition de cuivre potentialisait considérablement l'effet bactéricide de l'acide ascorbique, mais ces auteurs n'avaient pas interprété correctement leurs observations. En fait, nous avons constaté que l'addition de 5 µM de sulfate de cuivre à 200 µ M d'acide ascorbique en présence d'oxygène constituait un système très actif sur toutes les espèces bactériennes étudiées à l'exception des spores et de Mycobacterium Tuberculosis. L'éventail d'activité paraît donc aussi étendu que les meilleurs antiseptiques habituellement utilisés pour l'épuration biologique de l'eau d'alimentation. Il nous a paru préférable de renforcer encore les concentrations en réactifs jusqu'aux valeurs de 200 µ M pour l'acide ascorbique et de 7,5 µ M pour le sulfate de cuivre. Au point de vue pratique il suffit, pour obtenir l'épuration de l'eau convenablement aérée, de dissoudre les réactifs dans les proportions indiquées et d'attendre au moins 10 minutes.

Nous avons constaté qu'à ces concentrations l'effet bactéricide se prolongeait en fait pendant plus de cinq heures. Devant le danger que pourrait peut être présenter l'absorption prolongée d'eau contenant des radicaux libres, il a paru indispensable de mettre au point un procédé assurant l'inhibition totale et définitive de ces derniers. Dans ce but nous avons étudié deux types de produits principaux, d'une part les agents chélateurs capables en séquestrant l'ion cuivre d'en inhiber l'activité catalytique, d'autre part des corps autoxydables et donc capables de consommer l'oxygène du milieu, c'est à dire un élément indispensable à la formation des radicaux libres. Nous avons enfin étudié l'effet de substances présentant des propriétés antioxydantes, qui, réagissant directement et préférentiellement avec le radical libre hydroxyle, entrent en compétition avec les autres substrats possibles. Tous les chélateurs essayés ayant avec le cuivre une constante de stabilité, exprimée en valeur logarithmique,

supérieure à 18 (E.D.T.A. disodique, cystéine, histidine) inhibent l'activité catalytique du cuivre à des concentrations équimoléculaires à ce dernier. Le glycocolle et l'acide citrique dont les chélates avec le cuivre ont une constante de stabilité inférieure à 18, (respectivement 8,62 et 14,20) ne manifestent une activité inhibitrice qu'à des concentrations bien supérieures. A notre connaissance, la constante de stabilité du chélate cystine - cuivre n'a pas été rapportée ; il semble logique, toutefois, d'expliquer l'efficacité inhibitrice de la cystine par un mécanisme analogue, puisqu'elle inhibe le système acide ascorbique - cuivre à une concentration équimoléculaire à celle de l'ion métallique ; elle agirait donc essentiellement comme chélateur. En revanche, la cystéine agit à la fois par ses propriétés antioxygènes et par ses propriétés chélatrices, que celles-ci lui soient propres ou attribuables à la cystine formée au cours de son oxydation. En ce qui concerne les antioxygènes, nos résultats expérimentaux établissent, comme on s'y attendait, le parallèlisme entre l'effet protecteur vis à vis des radiations (cf. p. 11, STAPLETON (82)) et leur pouvoir inhibiteur sur le système chimique étudié. Nous avons vérifié d'autre part que le pouvoir inhibiteur du dibromhydrate d'aminoéthylisothiouronium (A.E.T.) se manifeste surtout aux pH voisins de la neutralité, ce qui s'explique, comme nous l'avons vu, par sa transformation en mercaptoéthylguanidine (M.E.G.) (26).

Les produits les plus intéressants par leur efficacité sont : l'histidine, le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (E.D.T.A.), la cystine et la cystéine. Etant donné l'absence de toxicité et la stabilité de la cystine et de l'histidine, il semble qu'on puisse dans la pratique, en préconiser préférentiellement l'usage.

Dans ces conditions, le procédé pratique d'épuration de l'eau se résume à la dissolution, à un intervalle d'au moins 10 minutes, tout d'abord du cuivre et de l'acide ascorbique, puis de l'acide aminé chélateur bloquant la formation des radicaux libres.

L'intérêt d'un tel procédé réside tout d'abord dans l'absence de modification de goût de l'eau traitée. Il y a là un avantage certain sur les procédés faisant appel aux produits chlorés. On sait en effet, que si la concentration de 0,5 p. p. m de chlore actif assure la destruction du poliovirus (54), il est nécessaire d'atteindre 1 p. p. m pour détruire le virus de l'hépatite épidémique (70). A cette concentration le goût de l'eau est tel qu'il est indispensable d'assurer l'élimination du chlore en excès pour pouvoir consommer l'eau.

Le procédé LAMBERT qui fait appel au permanganate de potassium ne laisse pas de saveur désagréable à l'eau, mais il se forme un précipité de bioxyde de manganèse, nécessitant soit une filtration, soit une décantation de l'eau avant sa consommation. Il a d'autre part été récemment démontré que contrairement à ce que pensaient SCHULZ et ROBINSON (78) il était indispensable d'utiliser des concentrations très supérieures à celles préconisées dans le procédé LAMBERT, (PELOUX (70), DARBON et Coll. (22)). PELOUX a montré qu'il fallait 158 mg de permanganate de potassium par litre d'eau pour inactiver en 30 minutes le poliovirus.

L'emploi de l'iode qui a été préconisé pour épurer l'eau, ne paraît pas utilisable d'une manière habituelle du fait des propriétés biologiques de ce corps.

Par ailleurs, les dérivés bromés dont l'usage a été envisagé semblent présenter les mêmes inconvénients que les dérivés chlorés, ceux-ci, aux concentrations actives, laissant une odeur très désagréable.

La non toxicité de chacun des constituants du système préconisé est assez remarquable. L'acide ascorbique et les amino-acides employés comme inhibiteurs sont des constituants normaux de la ration alimentaire quotidienne.

Quant au cuivre, l'O.M.S. admet 1 mg par litre d'eau, mais l'alimentation en fournit des quantités beaucoup plus considérables, le vin (36,23 mg par litre), le pain (2,05 mg par kg), la viande (2,50 mg par kilog); d'après le Mémento Scientifique Geigy. Dans certains pays étrangers, ce métal est parfois ajouté à des conserves alimentaires de légumes pour obtenir le verdissement (haricots verts, petits pois, etc...). En fait, il constitue un oligo-élément indispensable aux êtres vivants tant animaux que végétaux. Ainsi BERTRAND (8) a montré depuis longtemps que ce métal était indispensable au développement d'Aspergillus niger en milieu synthétique. On le rencontre comme constituant de l'hémocyanine où il joue un rôle analogue à celui du fer dans l'hémoglobine. Chez les mammifères, on connaît l'existence d'une hémocupréine des hématies et du plasma, et d'une autre protéine cuivrée, la céruléoplasmine, localisée dans les β 1 globulines. C'est à cette dernière qu'on a attribué des propriétés oxydasiques importantes, en particulier les caractères d'une oxydase de la catégorie de la laccase. Au point de vue physiologique, on attribue à la diminution de la céruléoplasmine dans le sérum, la diminution du pouvoir oxydasique constaté dans la maladie de Wilson . Dans d'autres affections telles que les états schizophrènes, on a noté une augmentation de la teneur en céruléoplasmine (AKERFELDT (2)). Cet aperçu schématique montre bien l'importance du cuivre dans l'organisme.

Le cuivre, tant sous forme métallique que sous forme ionique, constitue un métal peu toxique, contrairement à ce que l'on pensait à la fin du siècle dernier. GALIPPE (37) montra que l'intoxication au cuivre était impossible car cet élément est émétique aux doses élevées. Il a d'autre part montré que l'intoxication chronique n'existait pas ; il s'astreignit à manger lui-même avec les personnes de son entourage des aliments préparés dans des récipients en cuivre, ces aliments avaient parfois été abandonnés 24 heures au contact des récipients avant d'être consommés ; dans le cas où les aliments avaient été préparés au vinaigre, ils étaient recouverts d'une faible couche de vert de gris. Il ne s'ensuivit aucun trouble chez GALIPPE et les sujets soumis à ce régime. Des travaux récents (18) ont établi que chez la souris la DL 50-trente jours de l'ion cuivreux injecté par voie intra-péritonéale est de 13,8 mg par kg. Il est certain que le cuivre apporté par l'eau de boisson à la dose préconisée ne présente aucune toxicité, même lors de consommations élevées.

CONCLUSIONS

L'acide ascorbique en présence de traces de cuivre et de l'oxygène moléculaire dissous dans l'eau, se comporte comme un système d'oxydoréduction dans lequel l'ion cuivre est alternativement réduit et oxydé et passe de la valence 2 à la valence 1 et vice versa. Ce système assure ainsi la rotation du cycle "ion oxydé $\rightleftharpoons$ ion réduit", tant que l'acide ascorbique agissant comme donateur d'électrons ne se trouve pas entièrement consommé par la réaction.

Chaque rotation, du fait de réactions en chaîne entraîne la formation transitoire de radicaux libres hydroxyles et perhydroxyles auxquels il convient de rapporter les propriétés bactéricides et virulicides observées. Les proportions relatives que nous préconisons par litre d'eau à épurer sont les suivantes :

200 µM d'acide ascorbique
7,5 µM de sulfate de cuivre

soit

35,2 mg d'acide ascorbique
0,47 mg d'ion cuivre

Pour obtenir l'épuration de l'eau convenablement aérée il suffit de dissoudre ces réactifs dans les proportions indiquées et d'attendre au moins 10 minutes. Dans ces conditions, on obtient la destruction de toutes les espèces bactériennes étudiées à l'exception des spores et de Mycobacterium tuberculosis. Tous les virus étudiés sont détruits (vaccine, herpès, poliomyélite et bactériophages).

L'efficacité de ce système s'est révélée suffisante pour ne laisser subsister que les spores dans l'eau du Rhône puisée en pleine ville de Lyon, dont la pollution est très importante, en éliminant tous les microorganismes sous forme végétative et tous les bactériophages.

Lorsque l'acide ascorbique et le cuivre sont ajoutés à l'eau, la formation des radicaux libres se poursuit pendant plusieurs heures et l'efficacité stérilisante sera évidemment d'autant plus marquée que la durée d'action aura été plus longue. La durée de 10 minutes que nous préconisons est donc une durée minimale, mais dans la pratique, suffisante . On a cependant toujours intérêt à la prolonger quand cela est possible.

Cette formation prolongée de radicaux libres présente un inconvénient. Il paraît donc indispensable d'arrêter leur formation avant l'absorption de l'eau. Ceci est possible en dissolvant à ce moment un second produit, chélateur capable de fixer le cuivre. Divers chélateurs sont utilisables ; parmi les plus intéressants, on peut citer l'histidine et la cystine qui à la dose équimoléculaire à celle du cuivre, inhibent totalement, instantanément et définitivement la formation de radicaux libres, Profitant de l'absence totale de toxicité de ces acides aminés, qui sont des amino-acides indispensables à l'organisme, nous ajoutons une dose double de celle rigoureusement indispensable, soit, 0,15 µM.

L'eau ainsi traitée ne présente aucun goût particulier.

Ce procédé qui se résume à la dissolution à 10 minutes d'intervalle, de substances (acide ascorbique - cuivre, acide aminé), non seulement dépourvues de toxicité mais qui sont des facteurs essentiels que doit fournir l'alimentation, et dont la conservation peut être correctement assurée, nous paraît supérieur aux procédés utilisés jusqu'ici comme moyens individuels d'épuration de l'eau d'alimentation.

Le Président de la Thèse :

R. SOHIER

VU et permis d'imprimer
LYON, le 9 Novembre 1962

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. LOUIS

VU, le Doyen :

M.H. HERMANN

BIBLIOGRAPHIE

1 - ACHESON (R.M.), HAZELWOOD (C.M.) - The free radical nature of aromatic hydroxylation effected by oxygen, ascorbic acid and ferroux ions.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 49.

2 - AKERFELDT (S.) - Oxydation de la NN diméthylparaphénylène diamine par le sérum de malades atteints de maladies mentales.
Science, 1957, 125, 177.

3 - ALEXANDER (P.), BACQ (Z.M.), COUSENS (S.F.), FOX (M.), HERVE (A.), LASAR (J.) - Mode of action of some substances which protect against the lethal effets of X-rays.
radiation, Reserch, 1955, 2, 392 - 415.

4 - BACQ (Z.M.), ALEXANDER (P.) - dans Principes de Radiobiologie, 1955, p. 365 (Masson et comp. Paris).

5 - BACQ (Z.M.), ALEXANDER (P.) - dans Principes de Radiobiologie, 1955, p. 384 (Masson et comp. Paris).

6 - BARRON (E.), MEIO (E. De), KLEMPERER (F.) -
J. Biol. Chem., 1936, 112, 625.

7 - BAXENDALE (J.H.) - Decomposition of hydrogen peroxides by catalyste in homogeneous aqueous solutions.
Advance in catalis, 1952, 4, 31.

8 - BERTRAND (M.D.) - Premières recherches sur le rôle du cuivre, oligoélément dynamique chez Aspergillus niger.
Bull. Soc. Chim. Biol., 38, p. 817.

9 - BONET-MAURY (P.), JUDE (A.), SERVANT (P.) - La mesure statistique de la virulence et de l'immunité.
Rev. Immunol., 1954, 18, 31.

10 - BOYLAND (E.), SARGENT (S.) - The local graying of hair in mice treated with X-rays and radiomimetic drugs.
Brit. J. Cancer, 1951, 5, 433.

11 - BRESLOW (R.), LUKENS (L.N.) - Mechanism of action of an ascorbic-acid dependent non enzymatic hydroxylating system.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 292.

12 - BUTLER (J.A.V.), SMITH (K.A.) - Action of ionizing radiations and radiomimetic substances on desoxyribonucleic acid.
Nature, 1950, 165, 847.

13 - BUTTIAUX (R.), MUCHEMBLE (G.), LEURS (TH.) - La colimétrie de l'eau sur les membranes filtrantes.
Ann. Inst. Pasteur, 1953, 84, 1010.

14 - CHABEREK (S.), MARTELL (A.E.) - dans organic sequestering agents, John Wiley and sons, New-York, 1959.

15 - CIER (A.), LEFIER (A.), RAVIER (M.A.), NOFRE (C.) - Action du radical libre hydroxyle sur les bases pyrimidiques.
C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 504.

16 - CIER (A.), NOFRE (C.), RANC (M.), LEFIER (A.) - Recherches sur les mécanismes de l'hydroxylation aromatique par des systèmes à processus radicaliques.
Bull. Soc. Chim., 1959, p. 1523.

17 - CIER (A.), NOFRE (C.), PAQUELIER (A.) - Toxicité sur souris des systèmes chimiques générateurs de radicaux libres.
C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 3536.

18 - CLEMENT (J.M.) - Contribution à l'étude de la toxicité de quelques ions métalliques et de leur chélate à l'acide éthylène diamine tétra-cétique.
Thèse Doct. Pharm. Lyon 1962.

19 - COLOBERT (L.), MONTAGNON (B.), NOFRE (C.), CIER (A.) - Effet microbicide sur E. coli de systèmes chimiques générateurs du radical libre hydroxyle.
Ann.Inst. Pasteur, 1962, 102, 278.

20 - COLOBERT (L.), MORELIS (P.) - Nouveau milieu sélectif pour l'isolement des entérocoques, d'emploi pratique pour leur recherche et leur numération dans l'eau.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 120.

21 - DALE (W.M.) - Brit. J. Radiol. Suppl., 1947, 1, 46.

22 - DARBON (A.), GIRIER (L.), HERVIEU (P.) - Contribution à l'étude de la résistance du virus poliomyélitique dans les eaux.
Revue des Corps de Santé des Armées, 1962, suppl. 3, 506.

23 - DEAN (A.C.R.), HINSHELWOOD (C.) - Induced and other variations in bacterial culture.
J. Chem. Soc., 1951, 1157.

24 - DEMEREC (M.), BERTAMI (G.), FLINT (J.) - A survey of chemicals for mutagenic action on E. coli.
Amer. Naturalist, 1951, 85, 119.

25 - DOHERTY (D.G.), BURNET (W.T.), SHAPIRA (R.) - Chemical protection against ionizing radiations.
Radiation research, 1957, 7, 13.

26 - DOHERTY (D.G.), SHAPIRA (R.), BURNET (W.T.) - Synthesis of aminoalkylisothiouronium salts and their conversion to mercapto-alkylguanidines and thiazolines.
J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 5667.

27 - DORVAULT - La nouvelle officine, tome 1, p. 993, Vigot édit., Paris 1955.

28 - DOUZOU (P.) - Activation of oxygen and oxidizing power of ascorbic-acid.
Action chem. et Biol. radiations, 1958, 4, 86.

29 - DUBININE (M.P.), SIDOROV (B.M.), SOKOLOV (M.M.) - Effets génétiques des radicaux libres.
Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R., 1959, 128, 172.

30 - DUBOS (R.) - Rapid and submerged growth of mycobacteria in liquid media.
Proc. Soc. Exp. Biology and Medecine, 1946, 63, 56.

31 - ELDJARN (L.), PIHL (A.) - dans Progress in radiobiology p. 249. (J.S. MITCHELL, BE. HOLMS, CL. SMITH) 1956 Olivier and Boyland Edimburg.

32 - ELDJARN (L.), PIHL (A.), SHAPIRO (B.) - dans 1st intern. Conf. peaceful uses atomic energy,
Geneva, 1955, 11, 335.

33 - ERICSSON (Y.) - The effect of ascorbic-acid oxydation on mucoids and bacteria in body secretions.
Acta Path. Microb. Scand., 1954, 35, 573.

34 - ERICSSON (Y.), LUNDBECK (H.) - Antimicrobial effect in vitro of ascorbic-acid oxydation.
Acta Path. Microb. Scand., 1955, 37, 493.

35 - FENTON (H.J.H.) - Further studies on dihydroxymaleic acid.
J. Chem. Soc., 1894, 65, 899.

36 - GAGYI (J.) - Kliss. Wschr., 1936, 15, 190.

37 - GALIPPE - Nouvelles expériences sur l'action toxique attribuée au cuivre et aux substances contenant du cuivre en combinaison.
C.R. Acad. Sci., 1877, 84, 718.

38 - GERO (E.), LE GALLIC (P.) - Influence du pH sur la cinétique de l'oxydation de l'acide ascorbique.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 54, 548.

39 - GRINSTEAD (R.R.) - The oxydation of ascorbic-acid by hydrogen peroxyde catalisis by ethylenediaminetetraacetoiron.
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 3464.

40 - GROTTEN (O.), BEZSSONOFF (N.) - Ann. Inst. Pasteur, 1936, 34, 548.

41 - HABER (F.), WEISS (J.) - The catalytic decomposition of hydrogen peroxyde by iron salts.
Proc. Roy. Soc., 1934, 147 A, 332.

42 - HOLDEN (M.), MOLLOY (E.) - J. Immunol., 1937, 33, 251.

43 - HOLDEN (M.), RESENICK (R.) - J. Immunol., 1936, 31, 455.

44 - IKEDA (S.) - Mem. Res. Inst. Food. Sci., 1960, 20, 31.

45 - JUNGEBLUT (C.W.) - J. exp. Med., 1935, 62, 517.

46 - JUNGEBLUT (C.W.) - J. exp. Med., 1939, 70, 315.

47 - KELLIE (A.E.), ZILVA (J.S.) - Biochem. J., 1935, 29, 1029.

48 - KHYM (J.X.), SHAPIRA (R.), DOHERTY (D.G.) - Ion-exchange studies of transguanylation reactions.
J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 5663.

49 - KLEIN (M.) - Le mécanisme de l'action virulicide de l'acide ascorbique. Amer. J. Med. Sci., 1945, 209, 693.

50 - KLIGER (I.J.), BERNKOPF (H.) - Nature, 1937, 139, 965.

51 - LANDSTEINER (K.), LEVADITI (C.) - Ann. Inst. Pasteur, 1910, 24, 833.

52 - LATARJET (R.) - Photorestoration, catalase restoration and peroxides effects for bacteria and bacteriophages. Strahlentherapie, 1956, 101, 580.

53 - LEPINE (P.), DANIEL (PH.), PELMONT (J.) et SLIZEWICK (P.) - Besoin nutritif des cellules de rein de singe. Ann. Inst. Pasteur, 1957, 92, 597.

54 - LEVADITI (C.), KLING (C.), LEPINE (P.) - Nouvelles recherches expérimentales sur la transmission de la poliomyélite par voie digestive. Action du chlore sur le virus poliomyélitique. Bull. Acad. Med., 1931, 105.

55 - LOEBL (H.), STEIN (G.), WEISS (J.) - Chemical actions of ionizing radiations on aqueous solutions. J. Chem. Soc., 1950, 2704.

56 - LOJKIN (M.) - A study of ascorbic-acid as and inactivating agent of tobacco mosaic virus. Contrib. Boyce Thompson Inst. 1937, 8, 445.

57 - LWOFF (A.) - L'induction. Ann. Inst. Pasteur, 1953, 84, 225.

58 - LWOFF (A.) , MOREL (M.) - Ann. Inst. Pasteur, 1942, 68, 225.

59 - MAXWELL (D.) - Actions chimiques et biologiques des radiations, 4ème série, les peroxydes organiques en radiologie. Masson édit. Paris, 1958, p. 96.

60 - MERZ (J.H.), WATERS (W.A.) - Oxydation involving the free radical hydroxyl. J. Chem. Soc., 1949, 515, et 2427.

61 - MYRVICK (C.), WEISER (R.S.), HOUGLUM (B.), BERGER (L.R.) - Etude sur les propriétés tuberculostatiques de l'acide ascorbique et de ses dérivés, et leur rôle possible dans l'inhibition du bacille tuberculeux par les urines. Am. Rev. Tuber., 1954, 69, 405.

62 - NIADAS (E.), ROBERT (L.) - Les cinétiques d'inactivation de l'oxydation cuivrique de l'acide ascorbique par certains agents complexants.
Experientia, 1958, 14, 399.

63 - NOFRE (C.), CIER (A.), LEFIER (A.) - Activation de l'oxygène moléculaire en solution aqueuse par les ions métalliques et leurs chélates.
Bull. Soc. Chim. Franc., 1961, p. 530.

64 - NOFRE (C.), CIER (A.), MICHOUSAUCET (C.), PARNET (J.) - Action de systèmes modèles producteurs de radicaux libres sur quelques stéroïdes.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 811.

65 - NOFRE (C.), CIER (A.), PAQUELIER (A.) - L'activité radiomimétique de l'ion ferreux chélaté.
Path. Biol., 1962, 10, 1203.

66 - NOFRE (C.), LEFIER (A.), CIER (A.) - Action du radical libre hydroxyle sur les bases puriques.
C.R. Acad. Sci., 1962, 253, 687.

67 - NOFRE (C.), WELIN (L.), PARNET (J.), CIER (A.) - Action du radical libre hydroxyle sur les acides aminés.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 11, 1237.

68 - PAQUELIER (A.), CIER (A.), MOURIQUAND (C.), CLEMENT (J.M.), NOFRE (C.) - Effet radiomimétique de l'ion ferreux chélaté.
C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 1227.

69 - PATT (H.M.) - Protective mechanisms in ionizing radiation injury.
Physiol. Rev., 1953, 33, 35.

70 - PELOUX (Y.) - Stérilisation de l'eau en ce qui concerne les virus.
Revue des Corps de Santé des Armées, 1962, supp. 3, 501.

71 - PELOUX (Y.), NOFRE (C.), CIER (A.), COLOBERT (L.) - Inactivation du virus poliomyélitique par des systèmes chimiques générateurs du radical libre hydroxyle.
Ann. Inst. Pasteur, 1962, 102, 6.

72 - PETERSON (R.W.), WALTON (J.H.) - J. Am. Chem. Soc., 1943, 65, 1212.

73 - PHILLIPS (L.L.) - Effects of free radicals on chromosomes of Barly.
Science, 1956, 124, 88.

74 - PIETTE (L.H.), YAMAZAKI (I.), MASSON (H.S.) - Identification of substrate free radical intermediate of peroxydase substrate oxydations by electron magnetic resonance. Free radicals in biological systems.
Academic press New-York, 1961, 195.

75 - PIHL (A.), ELDJARN (L.) - dans Advances in Radiobiology p. 147 (G.C. de HEVESY, A.G. FORSSBERG, J.D. ABATT) 1957, Olivier and Boyd Edimburg.

76 - REED (L.J.), MUENCH (H.) - Amer. J. Hyg., 1938, 27, 493.

77 - SCHEINBERG (I.H.), GITLIN (D.) - Science, 1952, 116, 484.

78 - SCHULTZ (E.W.), ROBINSON (F.) - J. Inf. Dis., 1942, 70, 193.

79 - SHAMRAI (E.F.), VEREMEENKO (K.M.), KHMELEVS'KII (Yu.V.), PRIKHOZHAN (V.L.) - Le mécanisme de stabilisation de l'acide ascorbique par les protéines et les amino-acides en solution.
Ukrain. Biokhim. Zhur., 1959, 31, 118.

80 - SPINCK (W.W.), AGNEW (S.), MICKELSEN (O.) - Effet de l'acide ascorbique sur le pouvoir bactéricide du sérum humain.
J. Immunol., 1942, 44, 289.

81 - STANLEY (W.M.) - Science, 1936, 83, 626.

82 - STAPLETON (G.E.) - dans Radiation Protection and Recovery (HOLLAENDER, A, Ed)
Pergamon Press, Oxford, 1960, p. 87 - 116.

83 - STRANGEWAYS (W.I.) - Amer. J. Trop. Med., 1937, 31, 405.

84 - THEILER (M.), GARD (S.) - J. Exp. Med., 1940, 72, 49.

85 - UDENFRIEND (S.), CLARK (C.T.), AXELROD (J.), BRODIE (B.B.) - L'acide ascorbique dans l'hydroxylation aromatique. Modèle d'un système.
J. Biol. Chem., 1954, 208, 731.

86 - URI (N.) - Inorganic free radicals in solution.
Chem. Rev., 1952, 50, 375.

87 - WEISS (J.) - Electron transition processes in the mechanism of oxydation and reduction reactions in solution.
Naturwissenschafen, 1935, 23, 64.

88 - WEISS (J.) - Radiochemistry of acqueous solutions.
Nature, 1944, 153, 748.

89 - WEISS (J.) - The free radical mechanism in the reaction of hydrogen peroxyde.
Advance in catalysis, 1952, 4, 343.

90 - WEISS (J.) - L'autoxydation des ions ferreux en solution aqueuse.
Experientia, 1953, 9, 61.

91 - WEISS (J.) - Sur le mode de formation de radicaux libres en milieu liquide.
Nature, 1958, 181 A, 825.

92 - WEISSBERGER (A.), LU VALLE (J.E.), THOMAS(D.S.)
J. Am. Chem. Soc., 1943, 65, 1934.

93 - WINICKI (B.), NOFRE (C.), CIER (A.) - Influence de la chélation par l'E.D.T.A. H_2Na sur les potentiels normaux d'oxydo-réduction des couples Fer (II) et (III), cuivre, (I) et (II) et étain (II) et (IV).

TABLE DES MATIERES

- INTRODUCTION 1
- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 2

Mode de formation physique du radical libre hydroxyle .. 3
Procédés chimiques de formation du radical libre hydroxyle 4
Les effets chimiques des systèmes générateurs du radical libre hydroxyle 7
Les effets biologiques des systèmes générateurs du radical libre hydroxyle 8
Les inhibiteurs des systèmes chimiques générateurs du radical libre hydroxyle 10

- TRAVAUX PERSONNELS 13

CHAPITRE I - Techniques et Méthodes 14
Evaluation de l'activité bactéricide 14
Evaluation de l'activité virulicide 16
Réactifs utilisés 17

CHAPITRE II - Recherches des concentrations relatives d'acide ascorbique et de sulfate de cuivre constituant un système actif 18
Activité bactéricide et virulicide de l'acide ascorbique utilisé isolément 18
Activité bactéricide et virulicide du système acide ascorbique - sulfate de cuivre 20
Recherche d'inhibiteurs susceptibles d'inhiber l'activité du système acide ascorbique - sulfate de cuivre sur E. coli 22

CHAPITRE III - Etude du système acide ascorbique - sulfate de cuivre sur plusieurs espèces bactériennes et sur plusieurs virus 24
Etude de cette activité sur les différentes bactéries 24
Etude de cette activité sur quelques virus 25

CHAPITRE IV - Influence de différents facteurs sur l'activité bactéricide et virulicide du système acide ascorbique - cuivre 27
Influence de la concentration en protéines 27
Influence de la nature de l'eau 28
Influence de la concentration en bactéries 29
Essais d'une dose double de la dose adoptée 29
Essais de stérilisation de l'eau du Rhône 30

- DISCUSSION 31
- CONSLUSIONS 36
- BIBLIOGRAPHIE 37

Imprimé au Centre de Documentation
et d'Equipement Pédagogiques
47 - 49, Rue Philippe de Lassalle
LYON 4e